

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-75748

(43) 公開日 平成8年(1996)3月22日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	33/557			
	33/542	Z		
	33/543	5 3 1		
	33/558			

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願平7-162297

(22) 出願日 平成7年(1995)6月28日

(31) 優先権主張番号 特願平6-146865

(32) 優先日 平6(1994)6月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000181147

持田製薬株式会社

東京都新宿区四谷1丁目7番地

(72) 発明者 山内 忠一

東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

(72) 発明者 寺澤 英之

東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

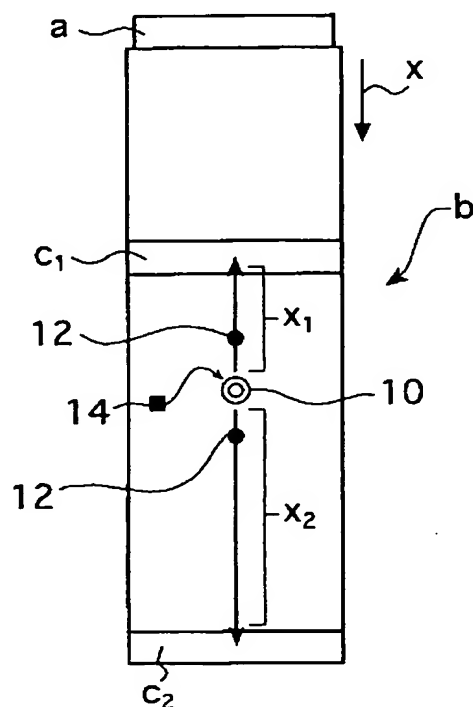
(74) 代理人 弁理士 渡辺 望稔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 特異結合分析方法および装置

(57) 【要約】

【目的】 汎用性に優れ、試料中の非特異反応物質、分析環境、試薬の失活等の活性の変化の程度など測定値の信頼性を低下させる要因を排除して、高精度かつ迅速な測定が可能な特異結合分析方法、およびその実施に好適な特異結合分析装置を提供する。

【構成】 特異結合に関与しかつ信号物質を発する信号物質発生体および前記液性試料を所定の流路を所定方向に流動させると共に、流路中において分析対象物の特異結合反応を発生させて流路中に分析対象物濃度に応じた信号物質発生体の分布を形成し、流路内に分布する信号物質発生体によって信号物質を発生させ、発生した信号物質を、流動方向に異なる位置に複数配置される検出手段によって検出し、この複数の検出結果より分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響が極小になるように演算処理を行うことにより、前記目的を達成する。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項 1】** 液性試料中の分析対象物を、その特異結合反応によって測定する特異結合分析方法であって、特異結合反応に関与しかつ信号物質を発生する信号物質発生体および前記液性試料を、所定の流路において所定方向に流動させると共に、前記分析対象物の特異結合反応を発生させ、この特異結合反応を利用して、前記流路中に液性試料中の分析対象物濃度に応じた信号物質発生体の分布を形成し、流路内に分布する信号物質発生体によって信号物質を発生させ、発生した信号物質を、前記流動方向に異なる位置に複数配置される検出手段によって検出し、この複数の検出結果を用いることによって、分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響が極小になるように演算処理を行うことを特徴とする特異結合分析方法。

**【請求項 2】** 請求項 1 に記載の特異結合分析方法の実施に利用される特異結合分析装置であって、液性試料導入部と、それに連結して配置される液性試料を流すことのできる流路と、液性試料中の分析対象物とそれに特異的に結合する特異結合物質との特異結合反応により前記流路内に形成された、液性試料中の分析対象物量に応じた信号物質発生体の分布を、前記信号物質発生体から発生される信号物質の拡散による物質移動に律速される信号強度として検出するための、前記流路の液流方向に対して異なる位置に配置される複数の検出部とを有することを特徴とする特異結合分析装置。

**【請求項 3】** 前記複数の検出部が、電気化学的信号検出を行なえる複数の電極である請求項 1 に記載の特異結合分析装置。

**【請求項 4】** 前記検出部の位置が、流動方向に  $10\ \mu\text{m}$  以上離れている請求項 2 に記載の特異結合分析装置。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【産業上の利用分野】** 本発明は、分析対象物と特異的に結合する物質（特異結合物質）と、分析対象物とによる特異結合反応を利用して、試料中の分析対象物を、非特異的な影響や夾雑物の影響なしに簡便・迅速・正確に測定することを可能とした特異結合分析方法、およびこの方法を実施するのに好適な特異結合分析装置に関する。

**【0002】** 詳細には、例えば、分析対象物と競合して特異結合物質と結合する物質、あるいは分析対象物に特異的に結合する物質等の特異結合反応に関与する物質であって、かつ直接あるいは間接的に信号物質を発生できる物質を標識（信号物質発生体）として用い、特異結合物質が不溶化された流路において、分析対象物と特異結合物質との少なくとも 1 つの特異結合反応を利用して、分析対象物の濃度に応じて検出部に対する信号物質発生体の相対的な距離の分布を形成し、さらに、信号物質発生体によって発生される信号物質を検出部によって検出

し、検出部において観測される信号強度が、信号物質発生体と検出部との距離（すなわち信号物質の拡散距離）に応じて変調することを利用して、分析対象物を分析する分析方法であって、前記検出部を流れ方向に対して異なる位置に複数配置することによって、夾雑物や温度等による影響を最大限に排除して、正確な分析を行うことを可能とした特異結合分析方法、およびこの分析方法の実施に好適な特異結合分析装置に関する。

**【0003】**

**【従来の技術】** 特異結合分析方法としては、抗原抗体反応を応用したイムノアッセイ、受容体を用いたレセプターアッセイ、相補的核酸配列のハイブリダイゼーションを用いた核酸プローブアッセイなど多くの方法が知られており、その特異性の高さから、臨床検査をはじめとする広い分野で繁用されている。これらの方法は、一般的に、特異結合反応後、未反応物の除去工程、いわゆる B/F 分離操作を必要とするヘテロジニアス法と、B/F 分離操作を必要としないホモジニアス法に分類される。

**【0004】** ヘテロジニアス法は、B/F 分離操作を行うことによって、未反応物および試料の干渉なしに特異結合反応の程度を検出できるため、比較的高感度の測定が可能で、汎用性に富んでいる。しかしながら、未反応物の分離操作は煩雑で、洗浄装置など、特殊な用具もしくは機器を必要とする場合があり、その簡易化や迅速化が求められている。

**【0005】** これに対し、操作を簡便化するために、凝集反応法、EMIT 法、酵素チャネリング法などのプロキシマールリンケージイムノアッセイ、免疫クロマトグラフ法など各種のホモジニアス法が開発されてきたが、性能および汎用性の点で、ヘテロジニアス法に及ばないのが現状である。特に、試料の存在下で検出反応を行うホモジニアス法では、B/F 分離操作を行った後に検出反応を行うヘテロジニアス法に比べて、試料の干渉や測定環境等に由来する誤差を受けやすいことも問題点として残っている。

**【0006】** このような誤差を小さくするために、通常、特異結合分析方法では、標準検体による測定値較正が行われている。すなわち、含有されている分析対象物量が不明の未知検体を、分析対象物量既知の標準検体と共に分析し、得られた未知検体の信号強度を標準検体の信号強度と比較することにより、未知検体の分析対象物量を求める方法である。一般には、分析方法の測定範囲に渡って、既知濃度の希釈列から構成される複数の標準検体の分析から信号強度と分析対象物濃度の応答曲線

（標準曲線）を作製し、この標準曲線を基準として未知検体の信号強度を分析対象物濃度に換算する方法が多用されている。従って、未知検体が 1 検体であっても、その分析には多数の標準検体の分析を並行して行う必要があり、操作が煩雑となり、経済的にも無駄を生じていた。また、試料の干渉や測定環境等に由来する非特異的

な測定誤差要因の別種の補正として、ブランク補正が汎用されている。これは、同一試料に対して分析対象物濃度に応答する特異結合分析と共に、分析対象物濃度に応答しない対照分析を同時に行い、その特異結合分析結果と対照分析結果との差分を、その分析結果として採用する方法である。しかし、この分析法においても、操作が煩雑であると共に、補正法としても不十分なため、前記した標準検体による測定値較正が必要とされていた。

【0007】しかも、近年では、在宅医療および地域医療の充実や、緊急性の高い臨床検査等の増加に伴ない、臨床検査の専門家でなくとも、迅速簡便で確実に測定が実施できる特異結合分析方法の開発がとみに望まれるようになってきた。通常、在宅検査や緊急検査は1検体ずつ迅速に行われる必要がある。従って、このような分析においては、余分な分析操作を必要とする上に時間と試薬の浪費でもある標準検体の同時分析は特に好まれない。その反面、測定の信頼性が特に問われる分野でもある。

【0008】このような問題点を解決するために、本発明者らは鋭意検討を重ね、液性試料中の分析対象物の特異結合反応を利用して、液性試料中の分析対象物の量に応じた信号物質発生体の検出部に対する距離の分布を形成させ、この分布を信号物質発生体が発生した信号物質の物質移動、すなわち拡散距離に律速される信号強度として検出部で検出するMEDIA (Mediator Diffusion-controlled Immunoassay) 法と呼ばれる特異結合分析方法を開発し、先にこれを提案した(特開平5-264552号公報、欧州特許公開公報0525723A2号参照)。この方法によれば、未反応物の除去操作なしに簡便かつ迅速に試料中の分析対象物を高感度に測定できる。しかしながら、他のホモジニアス法と同様に、この分析方法でも、試料の干渉、反応温度などの測定環境、あるいは分析に用いている試薬の変化などが、検出部で検出される信号強度に対して影響を与えることがあり、試料中の分析対象物量を測定する場合の誤差が存在する場合があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は前記従来技術の問題点を解決するために成されたものであり、特異結合分析の原理を利用した、未反応物の分離操作(洗浄操作)を伴わない、簡便で汎用性に優れた分析方法であって、試料が測定に与える非特異的な影響や反応温度などの分析環境、分析に用いている試薬の失活等の活性の変化の程度など測定値の信頼性を低下させる要因を排除して、高精度かつ迅速な測定が可能な特異結合分析方法、およびこの特異結合分析方法の実施に好適な特異結合分析装置を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために、本発明の特異結合分析方法は、液性試料中の分析対

象物を、その特異結合反応によって測定する特異結合分析方法であって、特異結合反応に関与しかつ信号物質を発生する信号物質発生体および前記液性試料を所定の流路を所定方向に流動させると共に、前記分析対象物の特異結合反応を発生させ、この特異結合反応を利用して、前記流路中に液性試料中の分析対象物濃度に応じた信号物質発生体の分布を形成し、流路内に分布する信号物質発生体によって信号物質を発生させ、発生した信号物質を、前記流動方向に異なる位置に複数配置される検出手段によって検出し、この複数の検出結果を用いることによって、分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響が極小になるように演算処理を行うことを特徴とする特異結合分析方法を提供する。

【0011】本発明の特異結合分析装置は、前記本発明の特異結合分析方法を実施するものであって、液性試料導入部と、それに連結して配置される液性試料を流すことのできる流路と、液性試料中の分析対象物とそれに特異的に結合する特異結合物質との特異結合反応により前記流路内に形成された、液性試料中の分析対象物量に応じた信号物質発生体の分布を、前記信号物質発生体から発生される信号物質の拡散による物質移動に律速される信号強度として検出するための、前記流路の液流方向に対して異なる位置に配置される複数の検出部とを有することを特徴とする特異結合分析装置を提供する。また、前記本発明の特異結合分析装置において、前記複数の検出部が、電気化学的に信号検出を行える複数の電極であるのが好ましい。さらに、前記本発明の特異結合分析装置において、前記検出部の位置が、流動方向に10 $\mu$ m以上離れているのが好ましい。

【0012】以下、本発明の特異結合分析方法および装置について詳細に説明する。はじめに、本明細書中の用語を説明する。

【0013】分析対象物とは、本発明の方法および装置により、測定される物質である。具体的には抗体分子や抗原として機能する各種蛋白質、ポリペプチド、糖蛋白質、多糖類、複合糖脂質など、あるいは核酸、エフェクター分子、レセプター分子、酵素、インヒビター等が例示される。さらに具体的には、 $\alpha$ -フエトプロテイン、癌胎児性抗原(CEA)、CA125、CA19-9等の腫瘍マーカーや、 $\beta_2$ -ミクログロブリン( $\beta_2$ m)、フェリチンなどの各種蛋白質；エストラジオール( $E_2$ )、エストリオール( $E_3$ )、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、黄体形成ホルモン(LH)、ヒト胎盤ラクトゲン(hPL)などの各種ホルモン；HBs抗原、HBs抗体、HBe抗原、HBe抗体、HBc抗体、HCV抗体、HIV抗体などの各種ウイルス関連抗原あるいはウイルス関連抗体；各種アレルゲンおよびこれに特異的なIgE抗体；麻薬性薬物、医療用薬物およびこれらの代謝産物；ウイルスおよび疾患関連ポリヌクレオチド配列の核酸等が例示される。

【0014】分析対象物類縁体とは、後記する特異結合物質との結合反応において、分析対象物と同様の挙動を示す物質をいう。例えば、分析対象物の構造的類縁物質であり、すなわち分析対象物の各種構造的アナログである。本発明では、主に、競合法による特異結合反応が行なわれる場合に、後記する信号物質発生体の構成成分として使用される。具体的には、分析対象物がステロイドなどの低分子のホルモンや薬物化合物などの場合には、その構造的類縁物とは、分析対象物と同一化合物あるいはその修飾化合物である。また、分析対象物が蛋白質や核酸、多糖類である場合には、特異結合反応に関与する部分ペプチド、部分オリゴヌクレチド、部分オリゴ糖なども構造的類縁体である。別の例として、分析対象物が抗体などの場合に、特異結合物質としての特異抗原に対して分析対象物と競合的に結合できる物質、具体的には抗体、レセプター、レクチンなどの前記分析対象物の各種機能的アナログも例示される。

【0015】液性試料とは、分析対象物が含まれると予測される液体のことである。具体的には、尿、血清、血漿、全血、唾液、涙液、髄液、乳頭などからの分泌液等が例示されるが、粘液、体組織あるいは細胞、菌体等の固形またはゲル状もしくはゾル状物を、緩衝液、抽出液あるいは溶解液等の液体に懸濁もしくは溶解させたものであってもよい。

【0016】特異結合物質とは、分析対象物等のある特定の物質に特異的に結合する、すなわち、特定の物質に特異結合反応しうる物質である。ある特定の物質とそれに対する特異結合物質との組合せとしては、抗原とそれに対する抗体、相補的核酸配列、エフェクター分子とレセプター分子、酵素とインヒビター、酵素と補因子、酵素と基質、糖鎖を有する化合物とレクチン、ある抗体とその抗体に対する抗体、レセプター分子とそれに対する抗体等が例示される。また、これらの組合せにおいて、どちらの物質も相手方の物質に対する特異結合物質となりうる。

【0017】また、特異結合物質として、特異結合活性が消失しない程度に化学修飾されたもの、あるいは、他の成分と結合してなる複合性物質もあげられる。このような特異結合物質としては、ビオチンで化学修飾された抗体もしくはポリヌクレオチド、アビジン共有結合抗体等が例示される。また、遺伝子組換え法で作成した抗体と酵素、あるいは抗体とレセプターとの融合蛋白質なども例示される。なお、本明細書では、次に説明する信号物質発生体のように、その一部に特異結合物質として働く部分を有する物質も、特異結合物質と称することがある。

【0018】信号物質発生体とは、分析対象物と競合して特異結合物質と結合する物質、あるいは分析対象物に特異的に結合する物質等の、特異結合反応に関与する物質であって、かつ直接または間接に信号物質を発生する

物質である。後に詳述するが、この信号物質発生体は、流路内で、分析対象物の量と相関関係を有する分布を形成する。つまり、信号物質発生体とは、特異結合物質として働く部分と、後記する信号物質の生成に寄与する部分とを有する物質、すなわち標識特異結合物質である。

【0019】特異結合物質として働く部分とは、分析対象物に対して特異結合物質となる構造、あるいは、分析対象物もしくは分析対象物類縁物質の構造を有する部分であり、信号物質の生成に寄与する部分とは、具体的には、通常の免疫反応等で標識剤として使用されている各種酵素等により構成される部分である。すなわち、信号物質発生体は、1つの側面として、分析対象物とそれに対する特異結合物質との特異結合反応に参加し、その流路内での分布が分析対象物量に応じて変化する物質であり、もう1つの側面として、信号物質の生成反応を司る物質である。

【0020】信号物質とは、信号物質発生体の関与する反応によって生成される物質であり、後記する検出部において、自身が所定の信号を発する、あるいは他の物質に信号を発生させる物質である。

【0021】信号物質の発生に関与する物質とは、字義通りの解釈をすると、前述の信号物質発生体も含むが、本発明においては、信号物質発生体以外の、主に、信号物質の前駆物質や、この前駆物質を信号物質に変化させるに寄与する物質を指す。例えば後述する電子メディエータあるいは電子メディエータを発生させる物質、酵素基質、酵素補因子、水素供与体等である。

【0022】また、信号の発生に関与する物質とは、信号物質が直接には信号を発生せず、他の物質に信号を発生させる物質である場合、あるいは、信号物質が他の物質の存在下でもしくは他の物質と協同して信号を発生する物質である場合に、信号の発生に寄与する物質のうち、信号物質を除いた物質をいう。

【0023】信号としては、電気化学的に計測可能な電子移動、蛍光光度計で計測可能な蛍光、発光光度計で計測可能な発光、目視判定および色差計で計測可能な呈色等が例示される。好ましくは、血球成分、色素などの存在する全血試料中等でも精度の高い測定が可能な電気化学的な測定である。

【0024】以上説明した特異結合物質、信号物質発生体、信号物質の発生に関与する物質、ならびに信号の発生に関与する物質は、あらかじめ反応系内に存在してもよいし、液性試料の導入に先立ち、あるいは液性試料と同時に、あるいは液性試料の導入後に、反応系内に導入されてもよい。なお、あらかじめ反応系内に存在する場合は、反応系内に均質に分布していてもよいし、反応系内の特定の箇所に備えられ、液性試料または試料以外の展開液によって溶解するものであってもよい。

【0025】流路とは、試料導入部から導入された液性試料が流れる経路であり、分析対象物および信号物質発

生体が展開され、分析対象物濃度に依存した特異結合反応が起こる場をいう。試料導入部から導入された液性試料は、ポンプなどの外圧、重力などの外力あるいは自発的な浸透力によって、流路内へ導入される。簡便な装置構成で、再現性ある液性試料の流路内への導入を可能とするためには、流路を細管（キャピラリ）あるいは狭い間隙で構成するか、あるいは流路を多孔性部材で構成して、液性試料の自発的な浸透力によって液性試料を流路中へ導入するのが望ましい。

【0026】例えば、流路を構成する細管あるいは多孔性部材に特異結合物質が不溶化されており、液性試料および信号物質発生体がここを所定方向に流れることで、特異結合反応が起こり、信号物質発生体が流れ方向に分布を示す。より具体的な例を挙げれば、分析対象物と信号物質発生体が、特異結合物質に対して競合的に特異結合するか、分析対象物が特異結合物質に結合し、さらに信号物質発生体が分析対象物にサンドイッチ型に特異結合する等、流路内あるいは流路の上流域で分析対象物の少なくとも1つの特異結合反応が起こることによって、流路は液性試料中の分析対象物の濃度に応じた信号物質発生体の分布が形成される場になる。なお、特異結合反応によって、信号物質発生体の試料の流れ方向の分布が決定される場である流路は、特異結合物質が不溶化されている例に限定されるものではなく、特異結合反応に伴って起こる分子量あるいは粒子サイズの変化等に基づいてそれを分布として示すものであってもよい。

【0027】検出部とは、到達した信号物質が発する信号を検出する部位であり、肉眼での目視で、もしくは、信号の性質に応じた好適な外部の計測器で、信号の変調の程度を計測できる部位である。本発明においては、この検出部を流路における液性試料の流れ方向に異なる位置に複数有することにより、分析対象物の濃度以外の要因、具体的には、夾雑物、粘度などの試料特性、反応（展開）温度等の環境条件、酵素活性の低下、基質の分解などの分析に用いている試薬の変化等に起因する分析結果への影響を最小化して、正確な分析を可能としたものである。

【0028】吸収部は、吸水性材料で構成され、必要に応じ、信号物質の発生に関与する物質等を保持する部位である。また、通常、吸収部は流路の下流域に設置され、導入された試料液を吸引し保持する役割もはたす。

【0029】以上のように定義された用語を用い、本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明の特異結合分析方法および装置の基本的な概念は、本出願人による特開平 5 - 2 6 4 5 5 2 号公報、欧州特許公開公報 0 5 25 723 A2 号により詳細に開示される。従って、同公報に開示される態様は、すべて本発明に利用可能である。

【0030】本発明の特異結合分析方法是、図 1 に概念的に示されるように、液性試料を導入する試料導入部 a と、それに連結した液性試料の流れる流路 b と、液性試

料の流れ方向（図 1 では矢印 x 方向）に対して異なる位置に複数設けられる（図示例では 2 つ）第 1 検出部 c<sub>1</sub> および第 2 検出部 c<sub>2</sub>（以下、両者をまとめて検出部 c と称することもある）とを有する装置によって行われる。図 1 に示される例において、分析対象物量未知の液性試料を試料導入部 a から装置内に導入し、分析対象物と特異結合物質との少なくとも 1 つの特異結合反応により、流路 b 内で液性試料中の分析対象物量に応じた信号物質発生体 10 の分布を形成させ、必要な場合には信号物質の発生に関与する物質 14 を反応させて、流路 b 内に分布する各々の信号物質発生体 10 によって信号物質 12 を発生させ、発生した信号物質 12 が、それぞれ流路内を拡散して検出部 c まで到達して発する信号を、検出部 c において計測する。

【0031】すなわち、図 1 においては 1 つの信号物質発生体 10 のみを例示するが、それぞれの検出部 c において計測されるのは、流路 b 内に分布する多数の信号物質発生体 10 から連続的に発生された信号物質 12 の拡散による物質移動に律速された信号に依存する。つまり、信号物質 12 の発生源である信号物質発生体 10 から検出部 c に至るまで、拡散によって信号物質 12 が流路内を移動しなければならない距離 x<sub>1</sub> および x<sub>2</sub> に依存した信号となる。

【0032】ここで、後に詳述するが、信号物質発生体 10 の分布は液性試料中の分析対象物の量に依存する。従って、試料導入部 a から流路 b に導入された液性試料中の分析対象物量が異なると、信号物質発生体 10 から検出部 c に至るまでの信号物質 12 の拡散距離の分布が分析対象物量に応じて異なる結果となり、この信号物質発生体 10 の分布の違いを検出部 c に到達した信号物質 12 が発する信号の違いとして検出することができる。本発明は、上記の仕組みを利用したものであって、複数の検出部 c において信号物質 12 が発する信号から液性試料中の分析対象物量を測定することを特徴とする特異結合分析方法および特異結合分析装置である。

【0033】前述のように、特異結合反応とは、分析対象物とそれに特異的に結合する特異結合物質（含信号物質発生体 10）との反応、特異結合物質と信号物質発生体 10 との反応等をいう。すなわち、本発明は、

①信号物質発生体 10 の標識によって発生され、かつ、検出部 c においてのみ検出可能な信号を発生するあるいは発生させる信号物質 12 を用いる場合、検出部 c において観測される信号は、標識（信号物質発生体 10）と検出部 c との距離（すなわち信号物質 12 の拡散距離）に応じた出力強度となること；

②分析対象物と特異結合物質との少なくとも 1 つの特異結合反応によって、信号物質発生体 10（すなわち標識）の位置分布を液性試料中の分析対象物濃度に応じて異なるものとできること；

③従って、検出部 c において検出される信号は、液性試

料中の分析対象物濃度に対応していること；をその分析方法の基本概念として、さらに、検出部 c を液流方向に対して異なる位置に備えられた複数の検出部、例えば、図示例のように第 1 検出部 c<sub>1</sub> および第 2 検出部 c<sub>2</sub> 等の複数の検出部によって上記信号を検出することにより、反応（展開）温度等の分析環境条件や、試料中に含まれる夾雑物、分析に用いている試薬の失活などの活性変化等の、分析対象物濃度以外の原因に起因する分析結果への影響を最小化して、正確かつ簡易な分析を可能としたものである。

【0034】本発明者らは、上記基本概念を見出し、先にこれを用いた特異結合分析方法および装置を提案した（特開平 5-264552 号公報、欧州特許公開公報 0525723 A2 号参照）。この分析方法は、MEDIA（Mediator Diffusion-controlled Immunoassay）法と呼ばれる。この分析方法（装置）によれば、未反応物の除去操作なしに、試料中の分析対象物を高感度、かつ迅速に測定することが可能である。しかしながら、この方法をもってしても、夾雑物の干渉、反応温度などの測定環境、分析に用いている試薬の活性の変化などの影響を完全

に拭うことは困難であり、未知試料中の分析対象物量を測定する場合の誤差が存在する場合があった。

【0035】このような問題点を解決するために、本発明者らが鋭意検討を重ねた結果、後に詳述するが、MEDIA（Mediator Diffusion-controlled Immunoassay）法と呼ばれる上述の特異結合反応を利用する分析方法において、液性試料の流れ方向に異なる位置に配置される複数の検出部によって検出される複数の信号、さらにはこの複数の信号と未知試料中の分析対象物量（すなわち信号物質発生体の分布）との間には、いずれの場合にも特定の関係を有することを見出した。さらに、この関係を実験的あるいは経験的に調査することにより、分析対象物の濃度（試料中の分析対象物の量）以外の要因による分析結果への影響、すなわち、夾雑物、反応（展開）温度等の環境条件、酵素活性の低下などの分析に用いている試薬の失活等による信号への影響を小さくできる演算式を作成できることを見出し、これを用いて信号の計測結果を演算処理することによって、より正確な特異結合分析が可能であることを見出して、本発明を完成

したものである。

【0036】すなわち、本発明は以下の技術的思想からなるものである。後の実施例でも詳述するが、本発明の分析方法（装置）において、流れ方向に異なる位置に配置された検出部において計測される信号は、同じ信号物質発生体由来する信号であるにもかかわらず、液性試料中の分析対象物濃度に対して異なる関数となる。なぜならば、検出部の位置が液性試料の流動方向、すなわち信号物質発生体の分布の形成方向に対して異なるために、特定の信号物質発生体の分布が形成されているにもかかわらず信号物質発生体と各検出部との距離分布はそ

れぞれの検出部ごとに異なっているからである。これは、同一分析対象物量に依存する特異的な信号強度成分が検出部ごとに実質的に異なることを意味する。本発明は、流れ方向に異なる位置にある検出部での分析対象物濃度に対する応答関数を複数用い、流路での信号物質発生体の分布を信号への非特異的な影響を含めて測定して、その結果非特異的な影響のうちでも加算的影響や比率的影響が混在しているような同一関数では表せない多様な影響を測定することができるので、この測定結果から、以下のように分析対象物濃度に非特異的な信号強度成分を極小にする関係式を見出すことができるようになり、信号強度変化を分析対象物濃度の適切な関係式として表すことができる。それぞれの検出部で計測されている信号は、特定の信号物質が拡散によって到達した時に発する信号を計測しているという点で全く同じ信号発生機構に由来しているため、液性試料中の夾雑物、反応（展開）温度などの環境条件、酵素活性の低下などの分析に用いている試薬の失活などによる信号への影響も非特異的な信号強度成分として同様に受けることになる。

【0037】各検出部で計測される信号は、分析対象物量に依存する特異的な信号強度成分と非特異的な信号強度成分との重ね合わせである。非特異的な信号強度成分には、単純化すれば、信号強度の差で除去できる成分と信号強度の比で除去できる成分とがあるがこれらの非特異成分は複数の電極に共通に存在していてそれぞれ信号強度として測定できるのでこれらの信号強度の間の関係を適切に示す演算式を選択することにより、分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響を小さくするような演算式（内部関係式）を作成でき、この内部関係式を用いて、複数の検出の計測結果から分析対象物量を求めることにより、試料や分析環境あるいは分析装置の経時変化等の影響を極小化できる、正確な特異結合分析を実現したものである。ここで、内部関係式とは、従来技術のように測定者が標準検体の分析によって得ることのできる標準曲線（外部関係式）に対して、あらかじめ装置内に演算機構として組み込むことが可能な信号と分析対象物との関係式を意味している。すなわち、本発明の特異結合分析方法（装置）は、未知検体の測定だけで分析対象物量を求め得る、いわゆるスタンダードレス分析法の新規な手法を提供する。このような技術的思想は、標準物質との特異結合反応あるいは標準信号発生反応を別途行うか、あるいは装置内で同時に行い、その標準信号を用いて未知検体の信号を判断する信号較正法とは全く異なる思想に基づいている。このような技術的思想およびこれを実施できる装置は従来全く開示されていない。

【0038】複数の検出部の流動方向の位置のズレの大きさには特に限定はないが、本発明者らの検討によれば、特異結合反応を利用する本発明においては、好ましくは複数の検出部を流路 b の液流方向に対して幾何学的



に  $10\ \mu\text{m}$  以上離して、より好ましくは  $100\ \mu\text{m}$  以上離して配置することである。これにより、特異結合反応によって形成された信号物質発生体 10 の分布に応じて信号物質 12 の物質移動（拡散）に律速され、かつ複数の検出部で検出される信号を有為に異なるものとして検出でき、分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響を好適に小さくできる演算式を作成して、正確な分析を実現することができる。すなわち、複数の検出部が、液流方向に少なくとも  $10\ \mu\text{m}$ 、好ましくは  $100\ \mu\text{m}$  離れていれば、試料中の分析対象物濃度に非特異的な信号強度成分のうち、流れ方向に位置が異なることによって特異的な信号成分に影響しない非特異成分（加算的影響）のみならず、特異的な信号成分に影響する非特異成分（比率的影響）も測定することができる。

【0039】本発明の特異結合分析方法は、特異結合反応によって、液性試料中の分析対象物の量に応じて、流路 b 内での信号物質発生体 10 の分布を変化させ、この分布の変化を、液性試料の流動方向に異なる位置に配置される複数の検出部で測定する。液性試料中の分析対象物の量に応じて、流路内の信号物質発生体 10 の分布を変化させる方法は、種々の方法が可能であり、以下に記載する方法は一例にすぎない。

【0040】本発明方法の分析対象物に対する特異結合物質を用いた特異結合反応の具体例として、免疫反応系の一成分が分析対象物である場合について、流路 b 内での免疫反応（特異結合反応）を例示する。

【0041】その第一は、分析対象物と同じ物質あるいはその類縁物質を不溶化して行う競合法である。この場合、流路 b の少なくとも一部には、分析対象物と同じ物質あるいはその類縁物質を不溶化しておき、信号物質発生体 10 としては、特異結合物質である抗分析対象物抗体と標識剤（例えば信号物質 12 を発生させる反応に関与する酵素）との結合体を用いる。液性試料にあらかじめ信号物質発生体 10 を混合しておき、これを流路 b に流すことにより、あるいは、流路 b の上流域に存在する信号物質発生体 10 を含む含浸部において信号物質発生体 10 と液性試料とを混合した後、流路 b の分析対象物（類縁物質）不溶化部分に流すことにより、試料中の分析対象物と不溶化された分析対象物（あるいはその類縁物質）とを、信号物質発生体 10 中の抗体部分（特異結合物質）に対して、競合的に反応させる。その結果、液性試料中の分析対象物量が多いほど、信号物質発生体 10 は流路 b 内のより下流側に分布が変動する。この方法は、分析対象物がハプテン様の低分子量物質の場合でも、分析対象物が高分子量物質の場合でも好適に用いることができる。分析対象物がハプテンの場合、分析対象物と同じハプテンかあるいは特異結合物質が交叉反応しうる別のハプテンを、特異結合物質が結合可能な様式で流路 b の少なくとも一部に不溶化すればよい。分析対象物が高分子量の蛋白質などの場合、蛋白質自体あるいは

特異結合物質が結合するエピトープのペプチドを流路 b の少なくとも一部に不溶化すればよい。

【0042】第二は、分析対象物が複数の抗体と同時に結合しうる高分子量物質の場合に好適なサンドイッチ法を用いる例である。この場合、流路 b の少なくとも一部には、分析対象物の第 1 の特異結合物質であるエピトープ A に対する抗体を不溶化しておき、分析対象物の第 2 の特異結合物質であるエピトープ B に対する抗体と標識剤との結合体を信号物質発生体 10 として、液性試料にあらかじめ信号物質発生体 10 を混合しておき、これを流路 b に流すことにより、あるいは、流路 b の上流域に存在する信号物質発生体 10 を含む含浸部において信号物質発生体 10 と液性試料とを混合した後、流路 b に流すことにより、分析対象物に反応させるとよい。すなわち、試料中の分析対象物をサンドイッチ型に反応させるのである。その結果、液性試料中の分析対象物量が多いほど、信号物質発生体 10 は流路 b 内のより上流側に分布が変動する。また、分析対象物が抗体の場合、流路 b の少なくとも一部には特異結合物質である抗原を不溶化しておき、抗（抗体）抗体と標識剤との結合体を信号物質発生体 10 として分析対象物に反応させるとよい。

【0043】第三は、分析対象物に対する特異結合物質を不溶化して行う競合法である。この場合、流路 b の少なくとも一部には、特異結合物質である抗分析対象物抗体を不溶化しておき、信号物質発生体 10 としては、不溶化特異結合物質に対して分析対象物と競合する物質である分析対象物と同じ物質あるいはその類縁物質と標識剤との結合体を用い、液性試料にあらかじめ信号物質発生体 10 を混合しておき、これを流路 b に流すことにより、あるいは流路 b の上流域に存在する信号物質発生体 10 を含む含浸部において信号物質発生体 10 と液性試料とを混合した後、流路 b に流すことにより、試料中の分析対象物と信号物質発生体 10 とを、不溶化された特異結合物質に対して競合的に反応させるとよい。その結果、液性試料中の分析対象物量が多いほど、信号物質発生体 10 は流路内のより下流側に分布が変動する。また、分析対象物が抗体の場合、流路 b の少なくとも一部には特異結合物質である抗原あるいはエピトープ部分を不溶化しておき、不溶化特異結合物質に対して分析対象物の抗体と競合的に結合する別の抗体と標識剤との結合体を信号物質発生体 10 として用いることができる。

【0044】ところで、上記説明では、流路 b の少なくとも一部に抗体あるいは抗原を不溶化させ、信号物質発生体 10 や分析対象物を抗体に直接あるいは間接に結合させたが、信号物質発生体 10 や分析対象物を流路 b に結合させなくても、すなわち先の例における抗体あるいは抗原が流路 b の少なくとも一部に不溶化されていなくても、分析対象物の量に応じて信号物質発生体 10 の流路 b 内での分布を変化させることは可能であり、そのような例も、本発明方法に含まれる。

【0045】例えば、分析対象物が微生物（例えば病原性真菌等）であり、信号物質発生体10が抗微生物抗体（抗病原性真菌抗体等）と標識剤とが結合してなる標識特異結合物質である場合、分析対象物（微生物）は、信号物質発生体10に比べてかなり大であるため、分析対象物と信号物質発生体10との複合体と、フリーの信号物質発生体10とでは、流路b内での移動速度、すなわち到達位置に大きな差を生じる。この場合には、流路bとして、例えば多孔性材質のものをを用い、そのメッシュ（ポアサイズ）を適正に選択することによって、あるいは、ゲル状もしくはゾル状担体を用い、その粘度を微生物サイズに応じて適正に選択することによって、この到達位置の差異を検出可能な差とすることができる。従って、分析対象物は、流路bには結合されないが、その流路b内での分布は局在化され、分析対象物と特異結合反応しうる信号物質発生体10は、分析対象物の局在化にともなって流路b内で分析対象物量に応じた分布をするようになる。

【0046】また、別の例として、フリーの標識抗体と

フリーの分析対象物との自発的な沈降性結合物（免疫沈降物）形成（いわゆるゲル内免疫沈降反応等）を利用した測定があげられる。この場合には、分析対象物の量に応じて免疫沈降物の形成量が変化し、また、形成された免疫沈降物は、多孔性材質および／またはゲル状担体からなる流路bの上流域に留まるが、免疫沈降反応に関与しなかったフリーの標識抗体は、流路bの下流域へ侵入し得るため、試料中の分析対象物量に応じて信号物質発生体10の分布が変化する。同様に、特異結合物質を不溶化した微粒子担体と分析対象物との特異結合凝集反応による微粒子の会合サイズの変化を信号物質発生体10の分布変化に利用することもできる。

【0047】続いて、本発明方法における信号の発生について、具体的に説明する。信号物質発生体が、酵素標識特異結合物質である場合を代表例として、図1および下記表1に基づいて説明する。

【0048】

【表1】



表 1 (その1)

信号	検出部	信号発生に到る反応形式
電	電	① 信号物質の発生に 関与する物質 p-7ミ/エーα- D-ガラクトース (基質) 加水分解反応 α-ガラクトシダーゼ標識 特異結合物質 信号物質発生体 → 電極 酸化還元反応 p-7ミ/エーα- D-ガラクトース + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> (4-4ミ/2.5-2加 キチン-1-イ)
		② 信号物質の発生に 関与する物質 グルコース + フェリシアン (Fe <sup>+++</sup> ) (電子供与体) 信号物質発生体 → 生成物 + 信号物質 酸化還元反応 グルコース + フェリシアン (Fe <sup>+++</sup> ) → フェリシアン (Fe <sup>+++</sup> ) + e <sup>-</sup> 電極
子	酵 素 電 極	③ 信号物質の発生に 関与する物質 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2還元型 (基質) 信号物質発生体 → 生成物 + 信号物質 酸化還元反応 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2酸化型 電子供与体 → 2還元型 電子供与体 電極
		④ 信号物質の発生に 関与する物質 グルコース + O <sub>2</sub> (基質) 酸化還元反応 グルコース + O <sub>2</sub> → 2H <sub>2</sub> O + 2e <sup>-</sup> グルコース脱 水素化標識特異結合物質 信号物質発生体 → 生成物 + 信号物質 酸化還元反応 グルコース脱 水素化標識特異結合物質 → 2H <sub>2</sub> O + 2e <sup>-</sup> 電極

表 1 (その2)

検出部	信号	信号物質の発生に 関与する物質	信号物質 + 生成物	信号物質 + 信号物質の発生に 関与する物質	酵素	生成物 + 信号
酵素 基質 不動化部	蛍光・発光	① 信号物質の発生に 関与する物質	信号物質発生体 → 生成物	信号物質 + 信号物質の発生に 関与する物質	酵素	生成物 + 信号
		グルコース + O <sub>2</sub> (基質)	酸化還元反応 グルコース + O <sub>2</sub> (基質) → グルコン酸 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (基質)	グルコン酸 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (基質) + 酸素	酸化還元反応 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (基質) → H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> (基質)	2,2'-ジアミノ酸 + hν
酵素 基質 不動化部	呈色	② 信号物質の発生に 関与する物質	信号物質発生体 → 生成物	信号物質 + 信号物質の発生に 関与する物質	酵素	信号
		尿酸 + O <sub>2</sub> (基質)	尿酸 + O <sub>2</sub> (基質) → 尿酸 + O <sub>2</sub> (基質)	尿酸 + O <sub>2</sub> (基質) + 酸素	酸化還元反応 尿酸 + O <sub>2</sub> (基質) → 尿酸 + O <sub>2</sub> (基質)	発色体 (呈色)

【0050】表1は、本発明方法における信号の発生を、典型的な6例について説明したものである。なお、表1中の各欄において、上段には、先に説明した本明細書中の用語を、また下段には、上段の用語で示されるものの具体例を示した。

【0051】まず、①であるが、これは検出部cが電極であり、信号が電子移動である例である。図1に基づいて説明する。この場合は、流路b内の信号物質発生体(α-ガラクトシダーゼ標識特異結合物質)10に、信号物質の発生に関与する物質(p-アミノフェニル-α

—D-ガラクトシド) 14が到達すると、信号物質の発生に関与する物質14が信号物質(p-アミノフェニル) 12に変化する。この信号物質12が拡散によって+400mV(vs. Ag/AgCl)に電位設定された検出部c1(電極)あるいはc2に到達すると、信号物質12は酸化(p-ベンゾキノンモノイミンとなる)され、同時に酸化電流という信号(電子移動)をそれぞれの検出部cで発生する。そこで、電気量や電流値として、信号である電子移動に係る数値を計測すればよい。

【0052】次に②であるが、これも、検出部cが電極

であり、信号が電子移動である例である。ただし、電子の受け渡しのための電子メディエータを用いている。同様に図 1 に基いて説明する。電子メディエータとは、本発明においては、酵素反応と電極反応との間を媒介して、両反応間の電子移動を可能ならしめる酸化還元化合物を総称して用いられており、その中には、両反応いずれにおいても不可逆な副生成物を実質的に生じず、両反応の間をサイクリング可能な物質を含んでいる。なお、電子メディエータとしては、具体的には、後述する表 3 に示されるような物質が例示される。この場合は、流路

b 内の信号物質発生体（グルコースオキシダーゼ標識特異結合物質）10 に、信号物質の発生に関与する物質（グルコースと酸化型電子メディエータであるフェリシニウムイオン）14 が到達すると、フェリシニウムイオンが還元されてフェロセンに変化する。この還元型電子メディエータであるフェロセンが信号物質 12 である。この信号物質 12 が拡散によって +400 mV (v s. Ag/AgCl) に電位設定された検出部 c<sub>1</sub>（電極）あるいは c<sub>2</sub> に到達すると、信号物質 12 は酸化されて再び酸化型電子メディエータのフェリシニウムイオンに戻り、同時に酸化電流という信号（電子移動）をそれぞれの検出部 c で発生する。また、この場合は、電子メディエータ間の電子ホッピング等による電子自体の拡散伝達と、その結果検出部 c において発生する信号（電子移動）の測定も考えられる。

【0053】また、③の場合は、流路 b 内の信号物質発生体（パーオキシダーゼ標識特異結合物質）10 に信号物質の発生に関与する物質（過酸化水素と還元型電子メディエータ）14 が反応すると、還元型電子メディエータが酸化型電子メディエータに変換される。この酸化型電子メディエータが信号物質 12 である。この信号物質 12 が拡散によって -150 mV (v s. Ag/AgCl) に電位設定された検出部 c<sub>1</sub>（電極）あるいは c<sub>2</sub> に到達すると、信号物質 12 は還元されて再び還元型電子メディエータに戻り、同時に還元電流という信号（電子移動）をそれぞれの検出部 c で発生する。なお、信号物質の発生に関与する物質 14 となる還元型電子メディエータ（水素供与体）としては、ヒドロキノン、p-フェニレンジアミン (PPD)、N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミン (DMPD)、N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン (TMPD)、N,N,N',N'-テトラエチル-p-フェニレンジアミン (TEPD)、N,N,N',N'-テトラキス-（2'-ヒドロキシエチル）-p-フェニレンジアミン (TCPD)、N,N,N',N'-テトラキス-（2',3'-ジヒドロキシプロピル）-p-フェニレンジアミン (TDHPD) 等が例示され、好ましくは TDHPD、TCPD、TEPD である。

【0054】④は、検出部 c が酵素電極であり、信号が電子移動である例である。この例では、酵素電極の性能を上げるために、酵素電極部分に、電子メディエータおよび/または導電性高分子化合物（ポリピロール、ポリチオフェンなど）を構成成分として含ませることも可能である。酵素電極の構成に関わらず、信号物質が検出部 c（酵素電極）と反応して信号（電子移動）を発生するあるいは発生させることに变りない。なお、好適な信号物質としては、酵素電極に対する基質、補因子あるいは補酵素が例示できる。また、信号物質が他の物質と協同して信号を発生する場合、すなわち、酵素電極が信号物質と他の信号の発生に関与する物質の存在下で信号を発生する場合には、この信号の発生に関与する物質を検出部 c および/または検出部 c 近傍に存在させておけばよい。この場合は、流路 b 内の信号物質発生体（グルコースオキシダーゼ標識特異結合物質）10 と、信号物質の発生に関与する物質（グルコースと溶存酸素）14 が反応すると、信号物質（過酸化水素）12 が生成される。この信号物質 12 が -150 mV (v s. Ag/AgCl) に電位設定された検出部 c<sub>1</sub>（パーオキシダーゼ電極）あるいは c<sub>2</sub> に到達すると、電子メディエータを介してあるいは介さずに、電子を電極から受け取り、それぞれの検出部 c（あるいはその近傍）に存在する信号の発生に関与する物質（水素イオン）15 と反応して信号物質 12 自身は還元される。その際、各検出部 c（パーオキシダーゼ電極）において、信号（電子移動）が発生する。

【0055】⑤は、検出部 c が酵素（パーオキシダーゼ）を実質上不動化してなる部分であり、信号が発光である例である。この例も、信号物質 12 自身は信号を発生しないので、信号の発生に関与する物質を使用する。この場合は、流路 b 内の信号物質発生体（グルコースオキシダーゼ標識特異結合物質）10 と信号物質の発生に関与する物質（グルコースと溶存酸素）14 が反応すると、信号物質（過酸化水素）12 が生成される。この信号物質 12 が、検出部 c<sub>1</sub>（パーオキシダーゼ不動化部位）あるいは検出部 c<sub>2</sub> に到達すると、信号の発生に関与する物質（ルミノール）15 を変化させ、信号（発光）を発生させる。従って、所定時間経過後に、あるいは所定時間経過後までの発光強度をそれぞれの検出部 c で測定すればよい。

【0056】⑥は、検出部 c が酵素（パーオキシダーゼ）を実質上不動化してなる部分であり、信号が呈色である例である。この例も、信号物質 12 自身は信号を発生しないので、信号の発生に関与する物質を使用する。この場合は、流路 b 内の信号物質発生体（ウリカーゼ標識特異結合物質）10 と信号物質の発生に関与する物質（尿酸塩と溶存酸素）14 が反応すると、信号物質（過酸化水素）12 が生成される。この信号物質 12 が、検出部 c<sub>1</sub>（パーオキシダーゼ不動化部位）あるいは検出

部 c2 に到達すると、信号の発生に関与する物質（オルトジアニシジン）を発色体に変化させ、信号（呈色）を発生させる。従って、所定時間経過後に、あるいは所定時間経過後までの呈色を、それぞれの検出部 c において、吸光度、反射光、肉眼等で測定すればよい。

【0057】また、上記の①～⑥において、信号物質の発生に関与する物質（酵素反応の基質に相当、ただし、溶存酸素ではない方）14と信号物質発生体10を構成する標識剤（酵素）は、交互に交換されてもよい。しか  
表

し、この場合、酵素を標識剤として用いた方が、反応効率に優れるのでよい。

【0058】本発明の特異結合分析方法において、信号物質の発生に好適な酵素（前記表1における信号物質発生体の一構成成分、標識）と、該酵素の基質（前記表1における信号物質の発生に関与する物質）との組合せの一例を、下表2に示す。

【0059】

【表3】

2

酵 素	基 質	発生される信号物質
ウリカーゼ	尿酸塩、 $O_2$	$H_2O_2$
コリンオキシダーゼ	コリン、 $O_2$	$H_2O_2$
コレステロールオキシダーゼ	コレステロール、 $O_2$	$H_2O_2$
シュウ酸オキシダーゼ	シュウ酸塩、 $O_2$	$H_2O_2$
サルコシンオキシダーゼ	サルコシン、 $O_2$	$H_2O_2$
スーパーオキシドシムターゼ	ピログロール	$H_2O_2$
キサンチンオキシダーゼ	キサンチン、 $O_2$	$H_2O_2$
グルコースオキシダーゼ	グルコース、 $O_2$	$H_2O_2$
西洋わさびオキシダーゼ	水素供与体（還元型）、 $H_2O_2$	水素受容体（酸化型）
$\alpha$ -ガラクトシダーゼ	p-アミノフェニル- $\alpha$ -D-ガラクトシド	p-アミノフェノール
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	p-アミノフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド	p-アミノフェノール
アルカリフォスファターゼ	p-アミノフェニルフォスフェイト	p-アミノフェノール
フォスフォジエステラーゼ	ビス-p-アミノフェニルフォスフェイト	p-アミノフェノール
乳酸デヒドロゲナーゼ	乳酸塩、NAD	NADH
キ酸デヒドロゲナーゼ	キ酸塩、NAD	NADH
$\beta$ -ガラクトースデヒドロゲナーゼ	ガラクトース、NAD	NADH
3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ	3-ヒドロキシ酪酸塩、NAD	NADH
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	グルコース-6-リン酸、NADP	NADPH
6-フォスフォグルコン酸デヒドロゲナーゼ	グルコン酸-6-リン酸、NADP	NADPH
ピンピン酸キナーゼ	フォスフォエノールビルビン酸、ADP	ATP
$\alpha$ -ガラクトシダーゼ	ラフィノース	ガラクトース
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	ラクトース	ガラクトース、グルコース
クエン酸リアーゼ	クエン酸	オキサロ酢酸
ビルビン酸キナーゼ	フォスフォエノールビルビン酸、ADP	ビルビン酸塩
フォスフォグルコムターゼ	グルコース-1-リン酸	グルコース-6-リン酸
	グルコース-1, 6-ニリン酸	

【0060】表2に示した組合せは、前記表1中の①および④～⑥の場合に用いることができる。しかしながら、①の場合（信号物質12の電極上での酸化還元反応によって信号を発生させる例）には、発生される信号物質12がp-アミノフェノール、ハイドロキノン、p-クレゾール等である組合せを用いるのがよい。これらは、銀・塩化銀電極に対して+数百mV程度の電位を印加すれば、十分に電極への電子移動が生じる。

【0061】また、前記表1中の②の場合には、表2中の基質として、 $O_2$  のかわりに、電子メディエータとして知られる酸化還元物質（酸化状態）を用いる。それにより、表1に示すように反応が行なわれ、信号物質12（還元状態の電子メディエータ）が発生され、この信号物質12から、①と同様に、電子メディエータに応じた電位を印加した電極に電子が放出され、電子メディエータ自身は酸化状態へ戻る。

【0062】電子メディエータの候補としては、金属イオン、金属錯体、ルテニウム錯体化合物、フェロセン化

合物、キノン化合物、ピオロゲン化合物、ポルフィリン誘導体など数多く知られている。この中には、水素供与体として酵素反応に関わる化合物も含まれる。

【0063】下表3に代表例を挙げるが、本発明ではこれらの化合物の化学修飾物や他の好適な電子メディエータも利用可能である。また、電子メディエータは、信号物質発生体10によって酸化状態から還元状態に変化するものに限定されず、逆に、還元状態から酸化状態に変化するものであってもよい。具体的には、西洋わさびパーオキシターゼの場合には、表2中の水素供与体、すなわち還元型メディエータを用いる。それにより、表1に示すような反応が行われ、信号物質（酸化型電子メディエータ）12が発生され、この信号物質から、前記①と同様に電子メディエータに応じた電位を印加した電極から電子を奪い、電子メディエータ自身は還元状態に戻る。

【0064】

【表4】

表 3  
代表的な電子メディエータ

フェロセン
ビニルフェロセン
酢酸フェロセン
モノカルボン酸フェロセン
1, 1'-ビスヒドロキシメチルフェロセン (BHMF)
Ru (bpy) :
Os (bpy) :
Fe (bpy) :
Fe (phen) :
Ru (bpy) : (im) :
Mo (CN) :
K <sub>2</sub> Fe (phen) (CN) :
Co (phen) : Cl :
K <sub>2</sub> Fe (CN) : または K <sub>2</sub> Fe (CN) :
ハイドロキノン
p-ベンゾキノン
カテコール
p-キノノン-ジオキシム
p-メチルフェノール
ハイドロキノンスルホン酸
ハイドロキシハイドロキノン
p-フェニレンジアミン (PPD)
N, N'-ジメチル-p-フェニレンジアミン (DMPD)
N, N, N', N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン (TMPD)
N, N, N', N'-テトラエチル-p-フェニレンジアミン (TEPD)
N, N, N', N'-テトラキス-カルボキシメチル
-p-フェニレンジアミン (TCPD)
N, N, N', N'-テトラキス- (2'-ヒドロキシエチル)
-p-フェニレンジアミン (THEPD)
N, N, N', N'-テトラキス- (2', 3'-ジヒドロキシプロピル)
-p-フェニレンジアミン (TDHPD)
2, 8-ジクロロフェノールインドフェノール
1, 2-ナフトキノン
フェナジンメトサルフェート (PMS)
5-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン
ピオシアニン
2, -アミノ-6, 7-ジヒドロ-4-ブテリドン
2-アミノ-1, 4-ナフトキノン
アントラキノン-2-サルフェート
2-アミノ-4-ブテリドン
メチルピオロゲン (MV <sup>2+</sup> )
ベンジルピオロゲン (BV <sup>2+</sup> )
金属ポルフィリン

略号の説明

bpy: ビピリジル、phen: o-フェナンスロリン、im: イミダゾール

【0065】前記表1中の④～⑥の例のように、二段階の酵素反応を行なわせる場合であって、信号は、一段目の酵素反応によって発生された信号物質12が他の物質に働きかけて生成される場合の二段目の反応に参与する物質は、次の通りである。

【0066】前記表1中の④には、検出部cが酵素電極である例を示したが、この場合は、一段目の反応によって発生される信号物質12の種類に応じ、酵素電極の酵

40

素が限定される。  
【0067】例えば、一段目の反応で発生される信号物質12が過酸化水素である場合は、検出部cを西洋わさび由来パーオキシダーゼなどのパーオキシダーゼを固定化した酵素電極(J. E. Frew et al, J. Electroanal. Chem., Vol. 201, 1 - 10, 1986 ; R.M. Paddock & E. F. Bowden, J. Electroanal. Chem., Vol. 260, 487 - 494, 1989 ; Ulla Wollenberger et al, Analytical Letters, Vol.23, 1795 -1808, 1990 など参照)とし、また、例えば、信号物質12がNAD<sup>+</sup>あるいはNADH

50

である場合は、検出部cを好熱菌由来のジアフォラーゼIを固定化した酵素電極(K. Miki et al, Analytical Sciences, Vol. 5, 269 - 274, 1989 など参照)とすればよい。

【0068】検出部cをこのような酵素電極とする場合は、表1に示したように、信号の発生に参与する物質として、電子メディエータを用いる場合がある。この場合、電子メディエータは、検出部において酵素反応と電極反応を媒介して、信号である電子の移動をおこす。なお、電子メディエータについては、先に表3に例示した通りである。

【0069】なお、酵素電極に類似のものとして、化学修飾電極が知られており、これらの酵素電極および化学修飾電極については、「R. W. Murray, Chemically Modified Electrode, Electroanalytical Chemistry, Volume 13, 191 - 368, Marcel Dekker, Inc., New York, 1984」, 「K. Nakamura, M. Aizawa & O. Miyawaki, Electroenzymology Coenzyme Regeneration, Springer - V

erlag, Berlin, 1988]、「V. J. Razumas, J. J. Jasaitis & J. J. Kulys, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Volume 12, 297 - 322, 1984」等に記載されている。

【0070】また、前記表1中の⑤の場合のように、信号が蛍光や発光である場合は、一段目の反応によって発生される信号物質12の種類に応じ、二段目の反応に関与する物質（酵素および酵素の基質である蛍光性（発光性）物質）が限定される。

【0071】例えば信号が蛍光であり、信号物質12が過酸化水素である場合は、二段目の反応に関与する物質が、パーオキシダーゼと、4-ヒドロキシフェニル酢酸、もしくは、3-（4-ヒドロキシフェニル）プロピオン酸との組合せである例がある。

【0072】また、信号が発光である場合には、次のような組合せが例示される。すなわち、信号物質12がATPの場合は、二段目の反応に関与する物質として、ホタルルシフェラーゼと、ルシフェリンおよび $Mg^{2+}$ との組合せが例示される。また、信号物質12がNADHの場合は、二段目の反応に関与する物質として、NAD(P)H:FMNオキシドレダクターゼおよび発光バクテリア由来のルシフェラーゼと、FMNおよびテトラデカノールなどの飽和長鎖脂肪酸アルデヒドとの組合せが例示される。

【0073】このような例において、検出部c1およびc2は、いずれも二段目の反応に関与する物質のうちのいずれか1種以上を不動化させてなるもので構成されるが、反応効率の観点からは、酵素を不動化させてなるものであるのがよい。

【0074】なお、蛍光や発光を信号とする場合には、前記表1中の①のように、信号物質12自体から信号を発生せしめることも可能である。すなわち、例えば、信号物質12の発生に関与する物質として、ルシフェリンの誘導体（例えばD-ルシフェリン-オ-リン酸）、信号物質発生体10を構成する標識剤として、アルカリフォスファターゼを選択し、信号物質12であるルシフェリンを発生させ、ATPおよび $Mg^{2+}$ の存在下に、ルシフェリンにルシフェラーゼを作用させれば、発光（信号）が生じる。この場合、検出部c1およびc2は、いずれもATP、 $Mg^{2+}$ およびルシフェラーゼのうちのいずれか1種以上を不動化させてなるもので構成されるが、反応効率の観点から、ルシフェラーゼを不動化させてなるものであるのが好適である。

【0075】さらに、前記表1中の⑥のように、信号が呈色である場合も、一段目の反応によって発生される信号物質12の種類に応じ、二段目の反応に関与する物質（酵素および酵素の基質である発色体の前駆物質）が限定される。例えば信号物質12が過酸化水素の場合には、二段目の反応に関与する物質が、パーオキシダーゼと、呈色物質の前駆物質である、5-アミノサリチル

酸、o-ジアニシジン、2, 2'-アジノジ-（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）ジアンモニウム塩（ABTS）、3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラゾン（MBTH）と3-（ジメチルアミノ）安息香酸（DMAB）の混合物、o-トリジン、3, 3'-ジアミノベンジジン（DAB）、1, 2-フェニレンジアミン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等との組合せが挙げられる。

【0076】また、信号物質12がNADHの場合には、二段目の反応に関与する物質が、ジアフォラーゼと、呈色物質の前駆物質であるヨードニトロテトラゾリウム・バイオレットとの組合せが挙げられる。この場合も、検出部c1およびc2は、いずれも二段目の反応に関与する物質のうちのいずれか1種以上を不動化させてなるもので構成されるが、反応効率の観点からは、酵素を不動化させてなるものであるのがよい。

【0077】以上、本発明方法における信号の発生について、具体例に即して説明したが、本発明方法における信号の発生機構は、これらに限定されない。

【0078】前述のように、本発明の特異結合分析方法を実施する分析装置は、基本的に、試料導入部a、流路bおよび複数の検出部c、さらに必要により、液性試料の流れる装置内のいずれかの箇所に、信号物質の発生に関与する物質および/または信号の発生に関与する物質を備えた装置である。

【0079】試料導入部aは、液性試料を流路bの所定の場所から導入させるために流路bに連結して設けられる部位であり、流路bへの液性試料等の入り口である。試料導入部aは、通常は流路bに連結した液性試料導入口であるが、分析に必要な液性試料を一時的に蓄える部位として作用させてもよく、また、必要に応じて、試料導入部aに夾雑物等を取り除くフィルターなどを設置してもよい。また、試料導入部aと流路bとの間に、または流路bの上流域に信号物質発生体10、信号物質の発生に関与する物質14、信号の発生に関与する物質、特異結合物質等、反応に必要な各種の物質を含浸した含浸部を設けてもよい。

【0080】流路bは、試料導入部aの下流に連結し、導入された液性試料の流動する部位であり、特異結合反応によって、液性試料中の分析対象物の量（分析対象物の濃度）に応じた信号物質発生体10の分布が形成される場所である。本発明においては、分析操作を簡便化するために、液性試料はポンプなどの外力を必要とせず、自発的に流路bを流れることが望ましい。そのため、流路bは細管や狭い間隙で形成されるキャピラリーあるいは多孔性部材で構成されている方が望ましい。また、流路bをキャピラリーあるいは多孔性部材で構成することにより、特異結合反応の反応効率が増大したり、信号物質発生体の分布が明瞭に形成されるなどの付加的な効果も期待できる。なお、液性試料の自発的な流れを増



強したり、流路bを通過する試料液量を増大させるために、必要に応じて、流路bの下流域に連結して吸収部を配置することもできる。

【0081】流路bは、例えば多孔性担体あるいはゲル担体で構成する。ただし、ゲル担体の場合は、試料と接触することによってゲル状態あるいはゾル状態となるものを用いるのがよい。好ましくは、多孔性担体である。あるいは、多孔性担体に、水溶性高分子化合物を含浸させ、乾燥させたものを流路bとして用いてもよい。さらには、前記多孔質担体等に固体状物質を保持させたもの

【0082】より具体的には、多孔性担体としては、セルロースアセテート製、ニトロセルロース製あるいはナイロン製の多孔性メンブレン、ガラス繊維製あるいはセルロース繊維製の濾紙、多孔性セラミックス等が、また、ゲル担体としては、寒天、アガロース、デキストラン、ポリアクリルアミド等が例示される。さらに、前記水溶性高分子化合物としては、デンプンおよびその誘導体、マンナン、ガラクトサン、寒天、アガロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、デキストラン、ゼラチン、カゼイン、コラーゲン、メチルセルロース (MC)、エチルセルロース (EC)、ヒドロキシエチルセルロース (HEC)、カルボキシメチルセルロース (CMC)、ポリビニールアルコール (ポバール)、ポリアクリル酸ナトリウムなどが例示できる。加えて、前記固体状物質としては、デキストラン等の多孔性粒子、ポリスチレン製等のラテックス、ガラス製微粒子等の微粒子、またはそれらに結合用の活性基を付与した微粒子が例示される。

【0083】流路bは、前記したように、特異結合反応の場であり、信号物質発生体が分布する場合でもあるので、この部分の構成が、検出結果に大きな影響を与える。そこで、分析対象物の種類、特異結合反応の方式（競合型、サンドイッチ型など）等に応じて、流路bを適当な性状を示すように構成することが望ましい。すなわち、その材質、大きさ（厚み）、ポアサイズあるいはゲル状態となった時の粘度（粘稠性）等を選択、調整することにより、信号物質発生体の分布状態や信号物質等の拡散速度を任意に調節する。

【0084】また、流路bを複数の構造および材質から構成させることにより、例えば積層体等とすることにより、その性状を詳細に調節することができる。例えば、流路bの検出部c<sub>1</sub> および c<sub>2</sub> いずれも近傍にポアサイズの小さい材質を用い、試料導入部a側には、ポアサイズの大きい材質を用いると、分析対象物量による特異結合反応後の信号物質発生体の分布の差異をより明瞭にできる。これを実現する具体例としては、ポリアクリルアミドのグラディエントゲルおよびポアサイズの異なる多孔性メンブレンの積層体等が例示できる。

【0085】流路bに分析対象物に対する特異結合物質

を存在あるいは不溶化させる場合、それは、全体に均等に存在させあるいは不溶化してもよいが、流路bの一部に局在させてもよい。また、上流側には多く存在あるいは不溶化させ、下流側には少なく存在あるいは不溶化させる等の濃度傾斜をつけてもよい。

【0086】なお、流路bに分析対象物に対する特異結合物質を不溶化させるには、多孔性担体あるいはゲル担体に共有結合あるいは吸着によって不溶化させればよい。また、流路bを複数の部材から構成する場合、あるいは、多孔性担体と水溶性高分子化合物とで構成する場合、あるいは、多孔性担体等とそれに保持される固体状物質とで構成する場合、特異結合物質の不溶化は、構成要素全てに対して行なってもよいし、一部にのみ行なってもよい。

【0087】本発明の装置の流路bの試料の流れ方向の長さは、小さくすればするほど、試料の必要液量を少なくできるが、小さくしすぎると、分析対象物の量に応じた信号物質発生体の分布の変化が明瞭でなくなる。従って、一般的には、10μm～数十mm程度とする。

【0088】検出部cは、到達した信号物質が発する信号を、肉眼での目視で、もしくは、信号の性質に応じた好適な外部の計測器で、信号の変調の程度を計測できる部位であり、液性試料の流れ方向に異なる位置に、流路bから信号物質12を受け取ることができる位置に複数配置される。複数の検出部cのうち、少なくとも1つは、流路b内での信号物質発生体10の位置分布の変化から生じる信号変調の大きい部位に設ければよい。通常は、流路bの最下流側あるいは最上流側である。別の検出部は、同様に流路b内での信号物質発生体10の位置分布の変化から生じる信号変調の大きい部位に設けてもよいし、あるいは、流路b内での信号物質発生体10の位置分布の変化から生じる信号変調を受けにくい部位に設けてもよい。

【0089】ただし、複数の検出部が流路b内での信号物質発生体の位置分布の変化に対して全く同等で、それぞれの検出部で信号変調に差が認められない場合には、複数検出部による本発明の分析が成立しない。従って、本発明においては、流路bの液流方向に対して異なる位置に複数の検出部を配置する。ここで、流路b内での信号物質発生体の分布の分析対象物量による変動は、基本的に試料液流の方向に起こるため、流路bの液流方向に対して異なる位置に複数の検出部を配置すれば、それぞれの検出部での信号変調は同等とはならない。

【0090】検出部における検出手段には特に限定はなく、信号物質による信号（あるいは信号物質によって検出部が発する信号）に応じて、各種の公知の手段が利用可能である。特に電気化学的測定が好ましく利用される。例えば、電気化学的信号であれば、検出部として各種の電極を用いればよい。具体的には、作用電極および対電極としては、白金、金、銀、カーボン電極等が使用

できるが、製造に適したカーボン印刷電極が好適である。この場合、電極基板としては、液体不透過性の板、例えばPETフィルム、塩化ビニル板あるいはガラス板などを使用してもよいし、液体透過性のシート、例えば濾紙などを使用してもよい。さらに微細な電極構成とするために、マイクロアレイ電極を作製することもできる。

【0091】また、前記電極の参照電極としては、Ag/AgCl電極等が例示される。これも、印刷技術等によって製造できる。

【0092】検出部cを酵素電極とすれば、電極反応の特異性や感度が上昇する。この場合には、信号物質は、酵素電極の基質もしくは補因子として作用し、電子が電極上で授受され、信号が測定される。酵素電極は、生化学分析あるいは分析化学分野では多数知られている。

【0093】信号が蛍光、発光、呈色等である場合は、各々、具体的には、検出部cは、発光反応に必要な少なくとも1つの信号の発生に関与する物質を実質上不動化した発光発生部、蛍光反応に必要な少なくとも1つの信号の発生に関与する物質を実質上不動化した呈色発生部等である。

【0094】さらに、検出部cが蛍光、発光、呈色等が検出される部位である場合、検出部cは、流路bまたは後記する吸収部の一部に、あるいは、検出部cの下流側に設けられた基板がある場合は、その基板に、信号の発生に関与する物質を不動化させることで作製することができる。その場合、不動化には、3-アミノプロピルトリエトキシシラン処理したガラス基板とグルタルアルデヒドとを用いて酵素を基板に結合する等の、種々の方法が利用できる。また、本発明の装置は、さらに、支持体（あるいは基板）やカバーを有していてもよい。

【0095】図2に、このような本発明の特異結合分析装置であって、電気化学的信号によって測定を行う特異結合分析装置の一例の分解斜視図を、図3にこの装置を組み立てた際の断面図を、それぞれ示す。図2に示される分析装置は、上から、上部カバー50、フィルター52、第1含浸部54、第2含浸部56、連通部材58、複数の検出部を有する電極部60、特異結合物質不溶化流路（マトリクス）62、吸収部64、および下部基板66を有して構成され、図3に示されるように、各部材が上記順番で積み重ねられて、組み合わされて構成される。

【0096】図示例の装置においては、上部カバー50（その試料導入口50a）、フィルター52、第1含浸部54、第2含浸部56および連通部材58によって試料導入部が構成される。なお、フィルター52、第1含浸部54、第2含浸部56および連通部材58は、分析に利用する特異結合反応や装置構成等に対応して、必要に応じてあるいは好ましい態様として配置されるもので

あり、本発明はこれらを有するものに限定されない。すなわち、本発明においては、試料導入口50aのみで試料導入部を形成して、ここから直接流路62に液性試料を導入してもよく、あるいは、その他の部材を必要に応じて適宜選択し、組み合わせて試料導入部を形成してもよい。

【0097】上部カバー50は、前述の各種の材料によって形成されるものであり、中心部分には液性試料を注入するための試料導入口50aが形成される。

【0098】フィルター52は、試料に含まれる測定に不要な固形物（妨害物質）を除去すると共に、試料の導入が均一に行えるようにするものであって、通常、織布、不織布等によって形成される。

【0099】第1含浸部54および第2含浸部56は、液性試料の種類、分析対象物、利用する特異結合反応等に応じて適宜配置されるものであって、ガラス繊維濾紙、セルロース繊維濾紙、不織布等に、信号物質発生体、信号物質の発生に関与する物質、信号の発生に関与する物質、電子メディエータおよびこれらの安定化剤もしくは保護剤、イオン強度および/またはpH調整のための塩成分、緩衝液成分、界面活性剤などの液性試料の流動円滑化剤等が含浸・乾燥されてなるものである。第1含浸部54や第2含浸部56を液性試料が通過することによって、信号物質発生体等が溶出して液性試料と混合され、あるいは反応が開始される。なお、1つの含浸部に保持される物質は複数であってもよく、また、図示例のように第1含浸部54と第2含浸部56とに分けずに、含浸部を1つとしてもよいのはもちろんである。

【0100】また、このような第1含浸部54や第2含浸部56等を有することによって、試料の流れ時間を長くして反応時間を十分に確保することが可能となる。さらに、図示例においては、好ましい態様として第2含浸部56の上面中心部分には水が通過不可能なシール部56aが形成される。シール部56aを有することにより、鉛直方向であった試料の流れを水平方向に変更することができ、試料の流れ時間をより長くして反応時間を十分に確保することが可能となると共に、混合効果によって反応効率が上り、より正確な測定を実現することができる。シール部56aの形成材料および形成方法には特に限定はなく、塩化ビニル、セルロースアセテート、ポリエステル等の各種の水不透性材料を、接着剤、例えばアクリル系接着剤等の手段を用いて第2含浸部56の中心部分に貼着すればよい。もしくは、水不透性樹脂あるいは水不透性ポリマーなどの薄膜を印刷法、光重合法あるいは光硬化法などで形成させればよい。

【0101】なお、本発明の分析装置（分析方法）においては、第1含浸部54や第2含浸部56等は必須要件ではないのは前述のとおりであるが、これらを有さない場合（これらに信号物質発生体等を含浸させない場合）には、信号物質発生体等の分析に必要な物質は、あらか

じめ液性試料と混合しておく、液性試料の注入の前あるいは後に試料導入口50aから注入する等の方法で反応系に導入すればよいのは前述のとおりである。

【0102】連通部材58は、第2含浸部56を通過した試料等を電極部60の貫通孔68を通過させて流路62に導入するものであり、ガラス繊維濾紙やセルロース繊維濾紙等より形成される。このような連通部材58は、必要に応じて、後述する電極部60の貫通孔68に挿入されて配置される。電極基板61の厚さが大きい場合には必ずしも必要ではない。

【0103】電極部60は、本発明の構成要素の一つである複数の検出部cが形成されるものであって、図示例の装置においては、電極部60は、PET（ポリエチレンテレフタレート）等の絶縁性基板61の上面に参照極／対極を、下面に検出部となる作用極が形成され、流路62に形成された信号発生体の分布に応じた電気的信号が作用極によって検出される。

【0104】図4（a）に電極部60の上面を、図4（b）に電極部60の下面を、それぞれ示す。図示例の電極部60の上面には、環状の対極（参照極）70およびその端子70aが形成され、対極70を除いて、斜線で示されるように絶縁層74が形成されている。一方、電極部60の裏面には、上面と同様にして、環状の第1作用極76およびその端子76aが形成され、さらに、第1作用極76と同一中心を有しかつ第1作用極76よりも大きな略環状の第2作用極78およびその端子78aが形成される。また、第1作用極76、第2作用極78および両者の間隙を除いて、斜線で示されるように絶縁層74が形成されている。すなわち、図示例においては、第1作用極76が図1の第1検出部c1に、第2作用極78が同第2検出部c2に相当する。さらに、絶縁性基板61には、対極70および第1作用極76の内側を貫通して貫通孔68が形成される。

【0105】前述のように、液性試料は貫通孔68あるいは必要に応じて貫通孔68に挿入された連通部材58を通過して後述する特異結合物質不溶化流路62に導入される。そのため、図示例の装置においては、特異結合物質不溶化流路62内での液性試料は貫通孔68すなわち第1作用極76の中心から外方向に向かって放射状に流れる。従って、図示例に示すように、電極（検出部）を同一中心を有しサイズの異なる環状とし、その中心から液性試料が流れる構成とすることにより、第1作用極76および第2作用極78は、液性試料の流れ方向に異なる位置に配置されることになる。なお、第1作用極76と第2作用極78との間隙には、特に限定はないが、10μm以上が好ましいのは前述のとおりである。

【0106】検出部となる第1作用極76および第2作用極78は、前述の各種の材料によって形成される。対極70は、銀電極、銀／塩化銀電極等で形成される。また、基板28は、PET、ポリ塩化ビニル、ポリイミ

ド、ポリエステル等の公知の各種の絶縁性材料で形成される。さらに、絶縁層36は、アクリル系樹脂、ポリエステル等の公知の各種の絶縁性インク材料で形成される。

【0107】なお、図示例の装置において、各作用極、対極（参照極）および絶縁層は、共に、スクリーン印刷、ドクターナイフ等の厚膜形成技術、スパッタリング、CVD等の薄膜形成技術等の公知の膜形成技術によって形成すればよい。

【0108】本発明において、第1作用極76、第2作用極78等の形状は図示例の環状に限定はされず、液性試料の拡散方向に異なる位置（好ましくは一定間隔）をもって配置されるものであれば、例えば、図5に示される形状等、様々な形状が利用可能である。また、本発明においては、複数の検出部は2つに限定されないのももちろんであり、例えば、図6に示されるように、3つの作用極を形成してもよく、あるいはそれ以上であってもよい。さらに、図示例においては、液性試料の特異結合物質不溶化流路62への導入点を中心に、これを囲む円周で検出を行っているが、これ以外にも、図1、図5bおよび図6bに示されるように、直線的な一方に異なる位置に配置される作用極としてもよいのはもちろんである。

【0109】特異結合物質不溶化流路62は、本発明の特異結合分析装置における流路bとして作用するもので、例えば、分析対象物および信号物質発生体と特異結合する抗体が不溶化して固定されており、液体試料中の分析対象物等の特異結合反応によって、液体試料中の分析対象物の量に応じた信号物質発生体の分布を形成する。特異結合物質不溶化流路62に形成された信号物質発生体の第1作用極76および第2作用極78からの距離分布が、信号物質を介して電流値として測定される。このような特異結合物質不溶化流路62は、前述の流路bと同様にして形成され、例えば、メンブレン等の多孔質膜に、特異結合反応のための抗体や抗原、核酸等を、不溶化して保持・乾燥してなるものである。また、余剰の試料は、特異結合物質不溶化流路62を通過して後述の吸収部64で吸収される。

【0110】吸収部64は、前述のように特異結合物質不溶化流路62を通過した余剰の試料を吸収するもので、例えば、クロマトグラフ濾紙などのセルロース濾紙、高吸水性ポリマーで形成される。また、吸収部64に信号物質の発生に関与する物質および／または信号の発生に関与する物質を含浸しておいてもよい。

【0111】図示例の装置においては、好ましい態様として吸収部64の上面中心部分に水が通過不可能なシール部64aが形成される。前述のシール部56aと同様、シール部64aを有することにより、鉛直方向であった試料の流れを水平方向に変更することができ、試料の流れ時間を長くして、特異結合反応の効率を向上させ

ると共に、流路内の信号物質発生体（標識体）分布が明瞭になり、より正確な測定を実現することができる。図示例の装置においては、複数の電極 7 6 および 7 8 が、シール部 6 4 a の巾以内に複数存在すると、第 1 検出部と第 2 検出部の信号強度の分析対象物濃度に対する応答が非特異的信号と共に検出でき、これに対し複数の電極の一方 7 6 をシール部 6 4 a の巾以内に設け、他方 7 8 をシール部 6 4 a の巾の充分外側に配置すればするほど、他方の電極 7 8 で検出される信号強度は分析対象物濃度に依存する部分が少なくなり、充分外側に配置すれば、実質的に非特異的信号のみを検出するように設計することができる。なお、シール部 6 4 a は、前述のシール部 5 6 a と同様に形成される。

【0112】図示例の分析装置は、これらの各部材を図 2 および図 3 に示される順序で、下部基板 6 6 上に積層して、上部カバー 5 0 と下部基板 6 6 とを貼り合わせ、あるいはねじ止め、ボルトとナット等を用いて固定して作製される。

【0113】このような分析装置においては、前述のように、試料は上部カバー 5 0 に形成される試料導入口 5 0 a より注入される。試料導入口 5 0 a より注入された試料は、フィルター 5 2 を通過して異物等を除去され、第 1 含浸部 5 4 に流入し、次いで第 2 含浸部 5 6 に流入する。含浸部に試料が流入することにより、乾燥・保持された信号物質発生体等が溶出し、試料と混合され、あるいは分析対象物の特異結合反応が開始される。なお、図示例においては、第 2 含浸部 5 6 の上面にはシール部 5 6 a が形成されるので、試料の流れ方向が鉛直方向から水平方向に変更され、十分な反応時間が確保できるのは前述のとおりである。

【0114】第 2 含浸部 5 6 を通過した試料は、連通部材 5 8 によって電極部 6 0 の貫通孔 6 8 を通過され、特異結合物質不溶化流路 6 2 に流入する。流路 6 2 に試料

$$I_1 = f_1 (C, Z)$$

$$I_2 = f_2 (C, Z)$$

$$\vdots$$

$$\vdots$$

$$I_n = f_n (C, Z)$$

であり、任意の少なくとも 2 つの式から Z の項を消去で

$$g_1 (I_1, C) - g_2 (I_2, C) = 0$$

$$\therefore h_1 (I_1, I_2, C) = 0$$

【0118】この②式は、測定信号強度  $I_1$  および測定信号強度  $I_2$  から分析対象物の未知量 C を求める方程式

$$C = k_1 (I_1, I_2)$$

従って、少なくとも 2 つの検出部の計測結果から、試料中の夾雑物 Z に影響されない分析対象物量 C を求めることが可能となる。さらに多くの検出部の計測結果があれば、推計学的により精度の高い結果を得ることもできる。

【0119】ただし、2 つの検出部によって検出される

が流入すると、特異結合物質不溶化流路 6 2 内で液体試料中の分析対象物の特異結合によって信号物質発生体の分布が決り、信号物質発生体の作用によって発生する信号物質が拡散によって第 1 作用極 7 6、あるいは第 2 作用極 7 8 に到達し、両作用極において、信号物質発生体の特異結合物質不溶化流路 6 2 内の作用極の半径方向の分布が、反応に対応した電気化学的信号として検出される。余剰の試料は、特異結合物質不溶化流路 6 2 を通過して吸収部 6 4 で吸収される。

【0115】第 1 作用極 7 6 や第 2 作用極 7 8 からの出力（電気信号のみならず各種の検出部からの出力）は、試料導入部に所定量の液性試料を添加し、所定時間経過後に、あるいは、所定時間が経過するまで連続的に、読み取りを行えばよい。なお、複数の検出部での信号計測は同時に行ってもよいし、別々に行ってもよい。複数の検出部での信号計測を別々に行う場合、各検出部を順々に反復して計測してもよい。また、データは、所定時間経過後の出力強度（例えば電流値）、所定時間内の出力強度の平均値、出力が所定強度となるまでの時間、連続的な出力の積分値（例えば電気量）出力が一定の強度になるまでの時間等として読み取ればよい。

【0116】前述のように、本発明は、特異結合反応を利用する分析方法において、液性試料の流れ方向に異なる位置に配置される複数の検出部によって検出される信号から、液性試料中の分析対象物の量以外の非特異的要因による分析結果への影響を小さくできる演算式を作成できることを見出し、これを用いて信号の計測結果を演算処理することによって、より正確な特異結合分析を可能としたものである。

【0117】ここで、試料中の分析対象物量を C、検出部の信号強度に影響する試料中の夾雑物量を Z、複数の検出部の信号強度を  $I_1$ 、 $I_2$ 、…… $I_n$  とすると、

$$\therefore Z = g_1 (I_1, C) \quad \text{①-1式}$$

$$\therefore Z = g_2 (I_2, C) \quad \text{①-2式}$$

$$\vdots$$

$$\vdots$$

$$\therefore Z = g_n (I_n, C) \quad \text{①-n式}$$

きる。例えば、①-1式と①-2式から、

②式

に他ならないから、この方程式の解である③式から分析対象物量 C を求めることができる。

③式

信号が同じ時、すなわち①式が次式のような場合、

$$I_1 = f (C, Z)$$

$$I_2 = f (C, Z)$$

$$\therefore I_1 = I_2$$

には C は求められない。

【0120】本発明の特異結合分析方法においては、液

性試料中の分析対象物との少なくとも1つの特異結合反応により、分析対象物量に応じた流路内での信号物質発生体の分布を形成させ、信号物質発生体から検出部まで拡散移動して信号を発する信号物質の拡散に律速される信号を計測しているため、通常、複数の検出部を液流方向に対して異なる位置に配置すれば、2つの検出部の信号強度は分析対象物量Cに対して、必ず異なる関数となる。液流方向に対して異なる位置とは、一般的には、検出部同士が液流に対して上流下流の関係にあることを意味する。ただし、電極サイズが大きい場合や電極形状によっては、液流方向に対して位置的に重なりを有する場合もありうる。このような場合でも、電極の幾何学的な中心あるいは電極端が異なっていれば、信号強度が異なることが期待されるので、液流方向に対して異なる位置に配置しているとみなせる。好ましくは、電極の幾何学的中心あるいは電極端が10 μm以上離れた位置に配置される。

【0121】本発明の特異結合分析方法および特異結合分析装置は、このように複数の検出部を用いることにより、分析対象物との特異結合反応による信号物質発生体の流路内分布に実質的に影響しない種々の非特異的影響を極小化することが可能である。本発明の特異結合分析方法および特異結合分析装置で極小化できる主要な測定誤差要因Zとして以下のようなものが例示できる。

【0122】I. 試料中の夾雑物質や試料特性による非特異的因子

試料に由来する信号物質発生体と類似の活性

例えば、信号物質発生体が西洋ワサビパーオキシダーゼの場合には、試料に由来するパーオキシダーゼ活性など試料に由来する信号物質発生体あるいは信号物質に対する妨害物質

例えば、アスコルビン酸、尿酸などの酸化還元物質、信号物質の発生に関与する物質が過酸化水素の場合には、カタラーゼ活性など

試料特性

例えば、信号物質の拡散定数に影響する試料粘度、信号物質発生体の活性に影響するpH、イオン強度、補因子濃度、インヒビター濃度

全血試料のヘマトクリット値など

II. 分析環境

例えば、反応温度など

III. 失活等の試薬成分の活性の変化程度

例えば、信号物質発生体の活性の変化

信号物質の発生に関与する物質の活性の変化

信号の発生に関与する物質の活性の変化など

【0123】これらの中には、分析対象物との特異結合反応による信号物質発生体の流路内分布に対しても実質的に影響する可能性のある因子が含まれているが、本発明の特異結合分析方法および特異結合分析装置は、これらの因子に対しても分析対象物との特異結合反応による

信号物質発生体の流路内分布に実質的に影響しない非特異的影響の部分の極小化することが可能である。

【0124】すなわち、上記の数式を用いた説明では、Zを検出部の信号強度に影響する試料中の夾雑物量としたが、一般に、Zが、Iの試料中の試料中の夾雑物質や試料特性による非特異的因子、IIの分析環境、あるいはIIIの試薬成分の失活程度のいずれの場合としても同じ説明が可能である。任意の試料の任意の分析に対して、その試料およびその分析において、これらの因子はそれぞれ定まっているから、これらの因子の総合的なパラメーターとしてZを定義しても同様の説明が成立する。すなわち、本発明の信号検出系では、図27に例示されるように、信号物質発生体（標識酵素など）によって信号物質（電子メディエータなど）を発生させ、発生した信号物質を検出手段（電極など）によって信号（電流など）として検出する。そのため、計測される信号強度は、信号物質が発生した場所（すなわち、信号物質発生体の存在場所）から検出手段までの信号物質の拡散距離、実質的には多数の分子を考慮した距離分布に大きく依存する。

【0125】ここで、図28に競合型の特異結合反応で例示するように、特異結合反応を利用して流路中に液性試料中の分析対象物濃度に応じた信号物質発生体の分布を形成させ、かつ、流動方向に異なる位置に配置された2つの検出手段によって前記の信号検出を行うとする。すると、各々検出手段は、ある特定の分析対象物濃度に対応して形成された信号物質発生体の分布を計測しているにも関わらず、信号物質発生体の分布に対する相対的な位置が異なるために信号物質発生体と検出手段との距離分布がそれぞれ異なり、その結果、一般に異なる信号強度を示す。つまり、2つの検出手段の信号強度は、液性試料中の分析対象物濃度に対して異なる応答曲線を示す。その各々の応答曲線は、複数の係数を有する数学的な関数（回帰式など）で近似できる。例えば、2つの検出手段での応答が線形関数の場合、信号強度Iと分析対象物濃度Cとの関数はいずれも $I = a \cdot C + b$ と表せるが、aおよびbの係数が各々の電極で異なっていることになる。

【0126】ところで、2つの検出手段の信号検出系は図29に例示したように同一であるので、液性試料中の非特異的な測定誤差要因Zの影響は同等に受けている。これらの測定誤差要因が信号強度に対して与える影響は、図31に示すように加算的影響と比率的影響に大別できるが、一般的には両者の影響が混在している。従って、加算的影響の補正を主たる目的として、この分野で汎用されている対照値を測定値から差し引くという補正法、いわゆるブランク補正だけでは精度の高い結果が得られない。また、従来のブランク補正法では、対照用の検出手段は、測定用の検出手段と同等の位置に、かつ、分析対象物濃度に対する応答を全く示さない様式で設置



しなければならないという制約があり装置構成が複雑になっていた。本発明の分析方法では、分析対象物濃度に応じて信号物質発生体の分布が形成される流路が存在するため、流動方向のいかなる位置に設置された検出手段も分析対象物濃度に多少とも応答するにも関わらず、精度の高い補正法を提供できる。さらに、本発明の分析方法では、非特異的な測定誤差要因 Z の加算的影響と比率的影響が混在していても、複数の検出手段に対して等しく影響を与えていることに着目して、その影響を極小化するように演算処理を行える。

【0127】つまり、本発明の分析方法によれば、複数の検出手段における信号強度と分析対象物濃度との応答関係と、複数の検出手段における信号強度と測定誤差要因 Z との関係とから、測定誤差要因の影響が極小である分析対象物濃度を求める関係式を導出できる。この導出方法には種々の方法が可能であるが、以下の方法が簡便で精度の高い方法として好ましい。

方法①測定誤差要因 Z の影響が極小化できるパラメータを用いる。この方法は、目的とする分析における測定誤差要因を予測し、その影響を極小化できるパラメータ（複数検出手段の信号強度の関数式）を選択し、予測される測定誤差要因の存在下で分析を行ってパラメータを最適化する方法である。一般に、加算的影響は複数の検出手段の信号強度の差をとることによって除去でき、比率的影響は比をとることによって除去できるから、後記するパラメータ式 P, Q, R などが例示できる。ただし、目的とする分析における測定誤差要因の影響を極小化できるパラメータであれば、いかなる式でもよい。

方法②分析対象物濃度に対する応答曲線の近似式の係数に測定誤差要因の関係式を導入する。この方法は、複数の検出手段における分析対象物濃度に対する応答曲線の近似式の係数に現れる測定誤差要因 Z の影響を関数関係として近似し、これら応答曲線の近似式と関数関係とから分析対象物濃度を求める式を導出する方法である。この場合も、目的とする分析における測定誤差要因を予測し、その予測される測定誤差要因 Z の存在下で分析を行うことにより、応答曲線の近似式の係数に現れる測定誤差要因 Z の影響をより精密に関数関係として表現でき、精度の高い分析が可能となる。

【0128】本発明は、未反応物の分離操作（洗浄操作）を伴わない簡便な方法であって、汎用性に優れ、迅速測定が可能でありながら、なおかつ、分析操作上何ら余分な操作なしに、特異結合分析の非特異的な影響による測定誤差を極小化することができる方法と、この方法の実施に好適な特異結合分析装置の提供を可能としたのである。

【0129】複数の検出手段の信号から液性試料中の分析対象物量を定量する方法について、さらに具体的に述べる。分析対象物、特異結合物質、信号物質発生体、信号物質、特異結合反応の様式、信号物質発生様式、検出手

の配置および分析装置の構成などによって、前述の式①の関数 f は決定される。しかしながら、これらの要素により関数 f は異なるので、その関数自体を数式化することは通常困難である。そこで、内部関係式となる③式を得る 1 つの方法は、Z は異なるが分析対象物量の同じ検体を複数選んで分析を行い、同じ分析対象物量 C における信号強度  $I_1$  と  $I_2$  との関係式を推定し、次いで、その関係式と分析対象物濃度 C との関係を推測することにより、内部関係式③式を得る方法である。この方法は、後述する実施例 2 に詳述されている。しかしながら、この方法は、内部関係式を得るために、多くの予備検討を必要とする。

【0130】もっと簡便な方法は、最初から③式が成立することを前提として、Z の影響を極小化できる内部パラメータを導入する方法である。内部パラメータとは、 $I_1$  と  $I_2$  の関数とすることができ、分析対象物、特異結合物質、信号物質発生体、信号物質、特異結合反応の様式、信号物質発生様式、検出手の配置および分析装置等、各種の要因によって決まる。

内部パラメータ  $P = u(I_1, I_2)$

従って、分析対象物量 C は内部パラメータ P の関数となり、これを③のかわりに内部関係式として用いることができる。

$C = v(P)$

【0131】内部パラメータは、Z の影響を極小化できる  $I_1$  と  $I_2$  の関数式であればいかなる関数式でも採用できる。一般的には、次のような関数が好ましい。

内部パラメータ  $P = I_1 - a \cdot I_2$

あるいは、

内部パラメータ  $Q = (I_1 - a) / (I_2 - b)$

なお、上記 a および b は定数である。

【0132】後述する実施例 3 において、ヘパリン血漿を試料とした場合に、これら内部パラメータ P および Q のいずれも、Z の影響を極小化することができることを具体的に示した。また、この方法は、Z が試料中の夾雑物の非特異的影響、反応温度、信号物質発生体の活性の変化のいずれの場合においても有用であることを、実施例 3, 4 および 5 において具体的に示した。また、実施例 6 において、全血試料でも同様の方法が有用であることを内部パラメータ Q の例で示した。以上の実施例はいずれも hCG を分析対象物としたサンドイッチ型の特異結合反応である。

【0133】内部パラメータは上記の P および Q の例に限定されるものではなく、P および Q を組み合わせた関数でも当然 Z の影響を極小化できる。例えば、

$$a I_1 - c I_2 + e$$

内部パラメータ R =

$$b I_1 - d I_2 + f$$

（上記式において、a, b, c, d, および f はいずれも定数である）等が例示され、一般に、Z の影響を低減



できる関数であれば、内部パラメータとして有用である。また、内部パラメータは、PあるいはQあるいはその組み合わせ関数であるRに限定されるものではなく、これらはその一例に過ぎない。液性試料の流動方向に異なる位置に複数配置された検出手段によって検出された複数の検出結果を用いて、分析対象物濃度以外の要因による分析結果への影響を極小化できる演算法は種々存在し、そのいずれの方法も利用できる。それらの演算法は極小化できる程度に関して差があるので、一般には最も極小化に有効な関数を内部パラメータとして採用すればよい。例えば、後記する内部関係式Sの例のように、上記内部パラメータRよりもさらに精巧な関数を導入することによって、分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響の極小化の程度を向上させることもできる。

【0134】ここで、信号強度  $I_1$ 、 $I_2$  として電流値を用いることができるが、実施例3、4、5、6、7および8のように電流密度（電流値／電極面積）を用いても、同様の処理が可能である。このようにして得られた内部パラメータおよび／または内部関係式を、あらかじめ計測装置の演算機構に組み込んでおくか、測定時に計測装置にパラメータとして入力し、計測後に演算させ分析対象物量を表示させることは特に望ましい。

【0135】あらかじめ計測装置の演算機構に組み込んである内部関係式に対して、分析装置に固有の定数を入力する方式は、分析装置のロット差を補正する上で好ましい。すなわち、上記した内部パラメータ関数の定数部分（例えば、内部パラメータ関数Rの場合におけるa、b、c、d、e、f）の一部あるいはすべてが分析装置のロットに依存する場合、分析を開始する前にこれらの

$$I_1 = \frac{a1 - d1}{1 + (C/c1)^{b1}} + d1 \quad \text{④式}$$

【0138】本発明者らは、実施例7の分析装置において各種全血試料にエストラジオールを添加した検体を測定した結果に基づき、Zの影響はa1とd1の2つの係数を変動させるが、b1とc1の2つの係数には大きな変動を与えないことを見出した。すなわち、④式にお

$$I_2 = \frac{a2 - d2}{1 + (C/c2)^{b2}} + d2 \quad \text{⑤式}$$

【0139】実施例7の分析装置では、第1検出部の場合と同様に、⑤式において、b2とc2は定数であるが、a2とd2とは全血試料に依存して異なるZの関数であった。また、実施例7の分析装置では、b1=b2

定数部分を計測装置にセットすることにより分析装置のロット差を補正することができる。これらの定数部分を計測装置にセットする方法としては、リングスイッチあるいはディップスイッチなどのハードウェアスイッチによる設定、キーボード、マウスあるいはペンなどの入力装置による入力、磁気テープあるいは磁気カードなどの磁気情報読み取り、センサー部の電気的特性値あるいはICメモリーなどの電気的情報読み取り、バーコードなどの光学的読み取りなど一般的な入力手段が利用できる。

【0136】次に、分析装置ロットに固有な内部関係式の係数部分の決定方法について、実施例7の全血試料中の分析対象物エストラジオールの競合反応法に基づいて例示する。実施例7では、前記した関係式導出方法②に従って、全血試料中のZの影響を極小化するためにロジスティック曲線に基づいた解析から導出された内部関係式Sを用いてZを極小化している。また、実施例8においては、この内部関係式に含まれる分析装置のロット依存性の定数項は、検定用血清試料から決定されている。全血試料の安定な長期保存は困難であるため、この検定用血清試料による分析装置のロット依存性の定数項決定方法は、検定用全血試料を用いた定数項決定法よりも標準化しやすく、また簡便でもあり、分析装置の製造時のロット管理に適している。

【0137】実施例7は分析対象物がエストラジオールというハプテンであり、特異結合反応として競合法を採用しているため、試料中の分析対象物濃度Cに対する第1検出部の信号強度  $I_1$  は、例えばロジスティック曲線（式④）のようなS字状曲線が適合する。

いて、b1とc1は定数であるが、a1とd1とは全血試料に依存して異なるZの関数であった。また、実施例7に例示した分析装置では、試料中の分析対象物濃度Cに対する第2検出部の信号強度  $I_2$  も、同様にロジスティック曲線（式⑤）が適合する。

=b（定数）および  $c1=c2=c$ （定数）と近似できた。④式および⑤式を変形すると、それぞれ⑥式および⑦式となる。

$$C = c \times \exp \left( \frac{\ln \left( \frac{a_1 - I_1}{I_1 - d_1} \right)}{b} \right) \quad \text{⑥式}$$

$$C = c \times \exp \left( \frac{\ln \left( \frac{a_2 - I_2}{I_2 - d_2} \right)}{b} \right) \quad \text{⑦式}$$

【0140】また、本発明者らは、実施例7の分析装置において各種全血試料を測定した結果に基づき、 $a_1$ と $d_1$ の間には関数関係が存在して、例えば $d_1 = f_1(a_1)$ と表すことができ、 $a_2$ と $d_2$ の間にも関数関係が存在して、例えば $d_2 = f_2(a_2)$ と表すことができることを見出した。さらに、 $a_1$ と $a_2$ の間にも関数関係が存在して、例えば $a_2 = g(a_1)$ と表すことができることを見出した。これらの関数関係式を用いると、⑥式および⑦式から、例えば $a_2$ 、 $d_1$ 、 $d_2$ を消去して、 $a_1 = h(I_1, I_2)$ という関数を求めることができる。これは、前記した関数関係から明かなように、試料に依存する係数 $a_1$ 、 $d_1$ 、 $a_2$ 、 $d_2$ のすべてが $I_1$ と $I_2$ とから求めうることを意味している。従って、⑥式あるいは⑦式から試料に依存する係数 $a_1$ 、 $d_1$ 、 $a_2$ 、 $d_2$ を消去して、 $I_1$ と $I_2$ から $C$ を求めることのできる内部関係式 $C = S(I_1, I_2)$ を誘導できる。それゆえ、この内部関係式 $C = S(I_1, I_2)$ は、種々の全血試料における非特異的な影響を最少にする。

【0141】ここで、信号強度 $I_1$ および信号強度 $I_2$ がそれぞれロジスティック曲線のようなS字状曲線に適合し、少なくとも $b_1 = b_2$ 、 $c_1 = c_2$ である時には、これらの和( $I_1 + I_2$ )あるいは差( $I_1 - I_2$ )もロジスティック曲線のようなS字状曲線に適合しうる。従って、 $I_1$ あるいは $I_2$ のいずれか一方、あるいは両方を和( $I_1 + I_2$ )あるいは差( $I_1 - I_2$ )としても上記説明と同様の処理が可能である。実施例7では、 $I_1$ と $I_1 + I_2$ を用いて内部関係式を求めている。

【0142】さらに、本発明者らは、実施例8において、この内部関係式に含まれる分析装置のロット依存性の定数項を全血試料ではなく検定用血清試料から決定できることを示している。これは、次のような方法で達成できる。すなわち、全血試料において、上記した係数 $a_1$ 、 $d_1$ 、 $a_2$ 、 $d_2$ がそれぞれ試料依存性を示すということは、前記した試料中の夾雑物、試料特性、分析環境あるいは試薬成分の活性変化などの $Z$ によって、 $a_1$ 、 $d_1$ 、 $a_2$ 、 $d_2$ が変化することを示している。ところで、係数 $a_1$ 、 $d_1$ 、 $a_2$ 、 $d_2$ は、それぞれ、第

1 検出部のS状応答曲線の下側漸近線、上側漸近線、第2 検出部のS状応答曲線の下側漸近線、上側漸近線の位置に相当する。これは、ある試料中において、分析対象物濃度が十分低い時の第1 検出部の信号強度が $a_1$ 、分析対象物濃度が十分高い時の第1 検出部の信号強度が $d_1$ 、分析対象物濃度が十分低い時の第2 検出部の信号強度が $a_2$ 、分析対象物濃度が十分高い時の第2 検出部の信号強度が $d_2$ であると言い換えることもできる。従って、これらの係数の間に前記した関数関係、例えば $d_1 = f_1(a_1)$ 、 $d_2 = f_2(a_2)$ 、 $a_2 = g(a_1)$ が見い出されるということは、これらの漸近線の位置は $Z$ に対して規則性を有して変動していることを意味している。一般的には、これらの関数関係は、例えば、次のような言葉で表現できる。 $d_1 = f_1(a_1)$ は、第1 検出部のS状応答曲線の下側漸近線が血清試料より高目になる全血試料では、第1 検出部のS状応答曲線の上側漸近線も高目になる傾向があることを示す。 $d_2 = f_2(a_2)$ は、第2 検出部のS状応答曲線の下側漸近線が血清試料より高目になる全血試料では、第2 検出部のS状応答曲線の上側漸近線も高目になる傾向があることを示す。 $a_2 = g(a_1)$ は、第1 検出部のS状応答曲線の下側漸近線が高目になる全血試料では、第2 検出部のS状応答曲線の下側漸近線も高目になる傾向があることを示す。

【0143】全血試料を複数測定すれば、これらの関数関係を見出すことができ、それらを用いて内部関係式を求めることは前記したが、全血試料を複数測定するという操作は、 $Z$ の値の異なる複数の試料を測定することによって、 $Z$ の影響が各係数にどのような規則性を持って出現するかという関数関係を決定することに他ならない。すなわち、このような分析装置に固有の内部パラメータ関係式を導出するために用いられる検定用試料としては、必ずしも全血試料である必要はなく、全血試料と同様の挙動を示すことがあらかじめ知られている $Z$ の値の異なる試料であればよいことになる。

【0144】このような検定用試料は、例えば、標準となる血漿に予測される $Z$ 要因を添加することによって得られる。添加する $Z$ 要因としては、夾雑物質、信号物質発生体と類似の活性、試料特性を変化させる因子、信号

物質発生体あるいは信号物質に対する妨害物質などが例示でき、例えば、パーオキシダーゼあるいはカタラーゼなどの酵素、ヘモグロビンなどの血色素成分あるいは溶血成分、アスコルビン酸、尿酸などの酸化還元物質、酸成分あるいは塩基成分などのpH変動要因、塩などのイオン強度変動要因、金属イオンあるいは補酵素などの補因子、酵素阻害剤、多糖類などの粘性物質などが好適なものとして例示できる。また、ヘマトクリット値を変動させるために添加できるZ要因として、ラテックス粒子、高分子微粒子球あるいは固定化血球などの血球類縁物質が例示できるが、ヘマトクリット値による影響を受けやすい電子メディエータ濃度あるいは酵素標識物質濃度を変動させるために電子メディエータあるいは／および酵素標識物質を添加した検定用試料も好適なものとして例示できる。さらに、Z要因は添加物質である必要はなく、分析環境変動因子として、反応温度を変化させて検定を行ってもよいし、高温あるいは高温条件下などで分析装置に含まれる試薬成分の活性を変化させてから検定を行ってもよい。ただし、検定手段はこれらの例示に限定されるものではなく、内部パラメータ関係式の決定が可能な検定手段であれば、いずれの手段も用いることができる。

【0145】実施例7あるいは上記した説明は、第2検出部の信号強度も分析対象物濃度に依存して応答する場合を例示している。ただし、第1検出部と第2検出部は液流方向に異なる位置に配置されているため、それぞれの検出部の信号強度の分析対象物濃度に対する応答は全く同等とはならず、そのため内部パラメータ関係式を導き出せることを示した。第1検出部と第2検出部の信号強度の分析対象物濃度に対する応答が全く異なるように、それぞれの検出部を配置することもできる。このような配置として、例えば図4の電極部60において、第1検出部76の配置は変えずに、第2検出部78の内径および外径を図2の分析装置例におけるシール部64aの直径より十分大きくして、第2検出部をシール部64aの十分外側に配置する場合を例示できる。この場合、第2検出部の信号強度は分析対象物濃度に実質上依存せず、Zにのみ依存すると見なせる。この場合、試料中の分析対象物濃度Cに対する第2検出部の電流応答 $I_2$ は、式⑤ではなく、次の式⑧が適合する。

$$I_2 = d_2 \quad \text{式⑧}$$

この場合も、第1検出部の応答式④あるいは式⑥と、第2検出部の式⑧、および、 $d_1 = f_1(a_1)$ 、 $a_2 = g(a_1)$ の関数関係式から、内部パラメータ関数 $C = S(I_1, I_2)$ を誘導できる。すなわち、流動方向に異なる位置に複数配置される検出手段が存在し、少なくともその内の1つの検出手段での信号応答が試料中の分析対象物濃度に依存すれば、分析対象物の濃度以外の要因による分析結果への影響を極小になるように演算処理を行うことができる。従って、流動方向に異なる複数の

検出手段の配置は、後記する実施例あるいは前記した例示に限定されるものではなく、分析装置の形状も後記する実施例あるいは前記した例示に限定されるものではない。

#### 【0146】

【実施例】以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。

【0147】〔電極部の作製〕厚さ0.25mmの透明PETフィルムの表側および裏側に、導電性カーボンインク(400-CT、アサヒ化研社製)、導電性銀ペースト(LS411N、アサヒ化研社製)およびレジスト(XB-101G、藤倉化成社製)を用いてスクリーン印刷し、図4に示されるような電極部60を各種作製した。まず、絶縁性基板61となるPETフィルムの表面に、カーボンインクを用いてスクリーン印刷を行い、対極(参照極)70、端子70aを形成し、次いで、絶縁性レジストを用いて絶縁層74を形成した。さらに、対極70を銀ペーストで上塗り印刷した。続いて、絶縁性基板61となるPETフィルムの裏面に、同様にして第1作用極76、端子76a、第2作用極78および端子78aをカーボンインクで形成し、さらに絶縁層74を形成した(すなわち、銀ペースト印刷はおこなっていない)。各電極および絶縁層を形成した後、PETフィルムを長さ50mm、幅20mmのサイズに切断し、さらに、対極70および第1作用極76の中心をパンチングして貫通孔68を形成し、図4に示されるような電極部60で、第1作用極76や第2作用極78、貫通孔68等のサイズが異なる電極部60を7種類作製した。

【0148】各電極部の諸元は下記のとおりである。なお、電極部60aから電極部60fまでの対極(参照極)は、電極部60の表面に第1作用極76と同位置に形成され、さらに全く同サイズ、同形状であるので、ここでは、電極部60の裏面の作用極の諸元のみを示す。電極部60gの対極(参照極)はサイズが異なるため、電極部60の裏面の作用極と共に表面の対極(参照極)の諸元も示す。

#### <電極部60a>

貫通孔68(第1作用極76の内径): 3mm、第1作用極76の外径: 5mm(すなわち、第1作用極76の幅1mm)、第1作用極76と第2作用極78との間隙: 0.5mm、第2作用極78の外径: 8mm(すなわち、第2作用極78の幅1mm)

#### <電極部60b>

貫通孔68(第1作用極76の内径): 3mm、第1作用極76の外径: 6mm(すなわち、第1作用極76の幅1.5mm)、第1作用極76と第2作用極78との間隙: 1mm、第2作用極78の外径: 11mm(すなわち、第2作用極78の幅1.5mm)

#### <電極部60c>

貫通孔68(第1作用極76の内径): 3mm、第1

作用極 76 の外径：6 mm（すなわち、第 1 作用極 76 の幅 1.5 mm）、第 1 作用極 76 と第 2 作用極 78 との間隙：1.5 mm、第 2 作用極 78 の外径：12 mm（すなわち、第 2 作用極 78 の幅 1.5 mm）

<電極部 60d>

貫通孔 68（第 1 作用極 76 の内径）：3 mm、第 1 作用極 76 の外径：5 mm（すなわち、第 1 作用極 76 の幅 1 mm）、第 1 作用極 76 と第 2 作用極 78 との間隙：2 mm、第 2 作用極 78 の外径：11 mm（すなわち、第 2 作用極 78 の幅 1 mm）

<電極部 60e>

貫通孔 68（第 1 作用極 76 の内径）：2 mm、第 1 作用極 76 の外径：5 mm（すなわち、第 1 作用極 76 の幅 1.5 mm）、第 1 作用極 76 と第 2 作用極 78 との間隙：1 mm、第 2 作用極 78 の外径：10 mm（すなわち、第 2 作用極 78 の幅 1.5 mm）

<電極部 60f>

貫通孔 68（第 1 作用極 76 の内径）：2 mm、第 1 作用極 76 の外径：5 mm（すなわち、第 1 作用極 76 の幅 1.5 mm）、第 1 作用極 76 と第 2 作用極 78 との間隙：1.5 mm、第 2 作用極 78 の外径：11 mm（すなわち、第 2 作用極 78 の幅 1.5 mm）

<電極部 60g>

貫通孔 68（第 1 作用極 76 の内径）：2 mm、第 1 作用極 76 の外径：4 mm（すなわち、第 1 作用極 76 の幅 1 mm）、第 1 作用極 76 と第 2 作用極 78 との間隙：0.5 mm、第 2 作用極 78 の外径：6 mm（すなわち、第 2 作用極 78 の幅 0.5 mm）

表面の対極（参照極）の内径：2.5 mm、対極（参照極）の外径：6 mm

【0149】作製した各電極部 60 について、第 1 作用極 76、第 2 作用極 78 および対極 70 が電気的に独立しており、また、それぞれに対応する端子 76a、端子 78a および端子 70a に電気的に接続されていることを確認した。

【0150】また、対極 70 に関しては、上述の銀ペースト電極をそのまま使用するか、あるいは、0.1 M 塩化ナトリウム水溶液中で電解反応（+1.0 V vs 銀/塩化銀電極）を 10 分間行うことにより、表面に塩化銀層を形成させてから、対極（参照極）として使用した。

【0151】【実施例 1】

hCG 特異結合分析装置における複数検出部の電流応答

【0152】<1>抗 hCG  $\beta$  抗体と西洋ワサビパーオキシダーゼとの結合体（標識抗体）の作製

hCG の  $\beta$  鎖を認識するマウス単クローン性抗体 HM81（持田製薬社製）を 100 mM 塩化ナトリウム-1 mM EDTA-60 mM トリエタノールアミン緩衝液（pH 8.0）（TEA 緩衝液）に 7.7 mg/mL 濃度となるように溶解し、窒素ガス置換した TEA 緩衝

液に十分に透析した。この抗体溶液 2.8 mL に対して、TEA 緩衝液中に調製した 50 mM の 2-イミノチオラン塩酸塩（Pierce 社製）溶液 143  $\mu$ L を添加し、攪拌後、窒素ガス雰囲気下、4℃で 1.5 時間静置した。その後、窒素ガス置換した 100 mM 塩化ナトリウム-1 mM EDTA-100 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）（EDTA-PB）で十分に透析し、SH 基が導入された抗 hCG  $\beta$  抗体 HM81 を得た。EDTA-PB で 20 mg/mL 濃度に調製された西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRPO、東洋紡社製）溶液 500  $\mu$ L を 30℃でゆっくり攪拌しながら、100 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）中に調製した 50 mM のスルホ SMCC（Pierce 社製）500  $\mu$ L を添加して 20 分間反応させた。反応後、窒素ガス置換した EDTA-PB で平衡化した Sephadex G-25（ファルマシア社製）カラム（2.6  $\phi$  × 15 cm）を通して未反応のスルホ SMCC を除去し、濃縮器 CENTRIPRE P-10（Amicon 社製）を用いて濃縮し、マレイミド化 HRPO を得た。得られたマレイミド化 HRPO の濃度は、403 nm の吸光度から求めた。3.66 × 10<sup>-7</sup> モルのマレイミド化 HRPO 溶液に対して、1/5 倍モル量の SH 基導入 HM81 抗体を添加混合後、窒素ガス雰囲気下、4℃にて 12 時間反応させた。次いで、EDTA-PB 中に調製した 500 mM のシステアミン溶液 129  $\mu$ L を添加し、窒素ガス雰囲気下、4℃にて 60 分間反応させ、その後、窒素ガス置換した EDTA-PB で平衡化した ULTROGEL AcA34（IBF Biotechnics 社製）カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。280 nm および 403 nm における吸光度測定を、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出分画について行い、遊離の酵素を含まない HM81 と HRPO との結合体の分画を集めて濃縮した。濃縮標品（HRPO-HM81 と称す）は、Phast システムによる電気泳動（ファルマシア社製）で分子量を確認後、吸光度と酵素活性から含有される抗体および酵素量を決定し、後記する測定において信号物質発生体として用いた。

【0153】<2>第 1 含浸部 54（信号物質発生体含浸部＝西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗 hCG  $\beta$  抗体を含浸させた乾燥体）の作製  
前記<1>で作製した西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗 hCG  $\beta$  抗体を 0.01% Amisoft LS-11（味の素社製）-5% 正常ウサギ血清（NRS）-10% サッカロース/0.1 M NaCl 含有 0.1 M リン酸緩衝液 pH 6.0 にて希釈した溶液を調製した。次いで、ガラス繊維濾紙（GA100、アドバンテック東洋社製）からパンチングして作製した直径 12 mm の円形濾紙に上記溶液を 140  $\mu$ L 点着し、凍結乾燥を行い、第 1 含浸部 54（信号物質発生体含浸部）を作製した。

【0154】<3>第2含浸部56（電子メディエータ含浸部＝N，N，N′，N′-テトラキス（2′-ヒドロキシエチル）-p-フェニレンジアミン2塩酸塩（THEPD）を含浸させた乾燥体）の作製

THEPDを0.01%Tween20-0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 pH 6.0に溶解し、5.0mMのTHEPD溶液を調製した。次いで、ガラス繊維濾紙（GA100、アドバンテック東洋社製）からパンチングして作製した直径12mmの円形濾紙に上記溶液を140μl点着し、凍結乾燥を行い、第2含浸部56（電子メディエータ含浸部）を作製した。

【0155】<4>吸収部64（過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体）の作製

過酸化水素および尿素（共に和光純薬工業製）を蒸留水に溶解し、3.0M過酸化水素-3.0M尿素溶液を調製した。次いで、クロマトグラフ濾紙（17Chr、Whatman社製）からパンチングして作製した直径12mmの円形ろ紙に上記溶液を120μl点着し、凍結乾燥を行い、吸収部64（過酸化水素-尿素的乾燥体）を作製した。従って、この吸収部は、信号物質の発生に関与する物質である酵素基質（過酸化水素）の存在部を兼ねている。

【0156】<5>抗体不溶化流路62（抗体不溶化メンブレン＝抗hCGα抗体不溶化多孔性セルロース混合エステル膜）の作製

0.45%塩化ナトリウム-0.076Mリン酸緩衝液（PBS）に、ウシγグロブリン（製品コードG7516、シグマ社製）を1.0%（W/V）濃度で溶解した溶液200mLを入れたビーカー中に、ポアサイズ8.0μm、直径13mmの円形の酢酸セルロース/硝酸セルロース混合エステル多孔性膜（カタログ番号SCWP01300、日本ミリポア工業株式会社製）200枚を入れ、ゆっくり攪拌しながら60℃で2時間加熱した。上澄みを除去し、さらに残液を吸引除去した後、洗浄液として十分量のPBSを加えてよく攪拌し、再度内容物を除去して洗浄を行った。PBSの洗浄をさらに2回行い、その後、蒸留水での洗浄を7回繰り返した。洗浄終了後、1.0%グルタルアルデヒド水溶液200mLを添加し、ゆっくり攪拌しながら25℃で3時間反応させた。反応後、蒸留水で10回洗浄を行い、ガラス板の上に多孔性膜を1枚ずつ並べて乾燥した。hCGのα鎖を認識するマウス単クローン性抗体HM21（持田製薬社製）を0.05M炭酸水素ナトリウム-0.05M塩化ナトリウム水溶液に溶解して1.0mg/mL濃度に調製した。この溶液を、ガラス板上で乾燥させた多孔性膜（13mmφ）当たり25μLを中央部分から浸潤させた。室温で1時間反応させた後、多孔性膜を0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）/PBS溶液200mLに移し、振とう攪拌しながら、4℃で2日間ブロック反応した。その後、0.1%Tween20/PBS

溶液で3回洗浄し、さらにPBSで7回洗浄した。次いで、4%マンニトール-0.01%Tween20/PBSに室温にて30min浸漬した後、シャーレ上で減圧乾燥を行い、抗体不溶化流路62（抗hCGα抗体不溶化多孔性セルロース混合エステル膜）を得た。

【0157】<6>特異結合分析装置の作製

このようにして作製した各部位、および先に作製した電極部60a～fを用い、下記のようにして、図2および図3に示される特異結合分析装置を各種作製した。まず、アクリル製の下部基板66上に吸収部64（過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体）を積層した。なお、吸収部中央には、メンディングテープ（住友スリーエム株式会社製）からパンチングして作製した直径6mmのシールを貼り付けた。次いで、抗体不溶化流路62（抗hCGα抗体不溶化多孔性セルロース混合エステル膜）をシール部64aを有する吸水部64上に中心位置を合わせて重積した。さらに、電極部60を貫通孔68の中心を抗体不溶化流路62の中心と一致して、作用極側を下にして電極部60を積層し、ガラス繊維ろ紙（GA55、アドバンテック東洋株式会社製）からパンチングして作製した直径2mmもしくは3mmの円形ろ紙を、電極の貫通孔にはめ込んで連通部58とした。次に、第2含浸部56（電子メディエータ含浸部）を、その中心が電極の貫通孔の中心と一致するように重積した。この第2含浸部56の上部表面中央に、メンディングテープからパンチングして作製した直径6mmのシールを貼り付けた。その上に、第1含浸部54（信号物質発生体含浸部）を重積した。さらにその上に、界面活性剤処理をしたエルタス（カタログ番号A05070、旭化成社製）からパンチングして作製した直径12mmの円形部材を重積してフィルター部52とした。その上に、直径6mmの試料導入口50aを有するアクリル製の上部カバー50を、その試料導入口50aの中心が貫通孔68の中心と一致するように上乗せし、上部カバー50と下部基板66の四隅のネジ孔を合わせネジ留めして、電極部60a～fのそれぞれを使用した、図2および3に示されるような、hCG濃度測定用の特異結合分析装置を6種作製した。

【0158】<7>各装置を用いたhCG測定

このようにして作製した各種の特異結合分析装置を用い、対極70（銀ペースト環状電極）を対極・参照極とし、第1作用極76（検出部1）あるいは第2作用極78（検出部2）と対極70の各端子とをポテンショスタットHA-150（北斗電工株式会社製）に接続した。また、ポテンショスタットにXY記録計および電極電位設定のためのファンクションジェネレーターHB-104（北斗電工株式会社製）を接続し、記録計からGPIBラインを通じてコンピュータへ接続し、計測およびデータ処理を行った。0.1%ウシ血清アルブミン-0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 pH 6.0

に標準 hCG を添加してそれぞれ、hCG 0IU/L、および hCG 1000IU/L の試料液を調製した。各試料液を 250 $\mu$ l、各特異結合分析装置に上部カバー 50 の試料導入口 50a を通じて導入した。試料導入後、各作用極を対極・参照極に対して -150mV となるように電位設定し、電流値をそれぞれ個別に記録した。

#### 【0159】<8>結果

図 7 に電極部 60a を用いて作製した特異結合分析装置による測定結果を、以下同様にして、図 8 に電極部 60b、図 9 に電極部 60c、図 10 に電極部 60d、図 11 に電極部 60e、および図 12 に電極部 60f を用いて作製した特異結合分析装置による測定結果を、それぞれ示す。なお、測定結果は、いずれも液性試料導入後、4 分後の電流値で、第 1 作用極 76 で測定された電流値を I<sub>1</sub>、第 2 作用極 78 で測定された電流値を I<sub>2</sub> とした。図 7～図 12 に示されるように、第 1 作用極 76 や第 2 作用極 78 のサイズが異なる場合であっても、複数の作用極（検出部）を有する電極部 60 を用いた装置のいずれにおいても、hCG 濃度に依存して電流値が変化した。これは、信号物質発生体（酵素標識抗体）の流路内の分布が、分析対象物である hCG 濃度に応じて変化していること、そして、いずれの複数検出部も、信号物質の拡散に律速された電流信号の変調としてこの信号物質発生体の分布の変化を検出していることを示している。

#### 【0160】【実施例 2】

特異結合分析装置を用いた hCG 濃度の測定

【0161】<1>界面活性剤（Tween 20）処理ガラス繊維濾紙の作製

ガラス繊維濾紙（GA100、アドバンテック東洋社製）を 0.2% Tween 20（和光純薬工業社製）水溶液に浸漬させ、室温にて一晩静置した。その後、蒸留水にて 10 回洗浄し、次いで、オーブン（80℃）にて乾燥させ界面活性剤（Tween 20）処理ガラス繊維濾紙を作製した。

【0162】<2>第 1 含浸部 54（信号物質発生体含浸部＝西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗 hCG  $\beta$  抗体を含浸させた乾燥体）の作製

前記実施例 1 の<1>で作製した西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗 hCG  $\beta$  抗体を 5% 正常ウサギ血清（NRS）-10% サッカロース/0.1M NaCl 含有 0.1M リン酸緩衝液 pH 6.0 にて希釈した溶液を調製した。この溶液を、先に<1>で作製した Tween 20 処理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径 12mm の円形濾紙に上記溶液を 140 $\mu$ l 点着し、凍結乾燥を行い、第 1 含浸部 54（信号物質発生体含浸部）を作製した。

【0163】<3>第 2 含浸部 56（電子メディエータ含浸部＝N, N, N', N'-テトラキス（2'-ヒ

ドロキシエチル）-p-フェニレンジアミン 2 塩酸塩（THEPD））を含浸させた乾燥体）の作製  
THEPD を 0.1M NaCl 含有 0.1M リン酸緩衝液 pH 6.0 に溶解し、5.0mM の THEPD 溶液を調製した。この溶液を、先に<1>で作製した Tween 20 処理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径 12mm の円形濾紙に上記溶液を 140 $\mu$ l 点着して凍結乾燥を行い、第 2 含浸部 56（電子メディエータ含浸部）を作製した。

【0164】<4>吸収部 64（過酸化水素および尿素を含浸させた乾燥体）の作製  
過酸化水素（和光純薬工業製）および尿素（和光純薬工業製）を蒸留水に溶解し、1.0M 過酸化水素-1.0M 尿素溶液を調製した。次いで、クロマトグラフ濾紙（17 Chr, Whatman 社製）からパンチングして作製した直径 12mm の円形ろ紙に上記溶液を 120 $\mu$ l 点着して凍結乾燥を行い、吸収部 64（過酸化水素-尿素の乾燥体）を作製した。

【0165】<5>抗体不溶化流路 62（抗体不溶化メンブレン＝抗 hCG 抗体不溶化多孔性ニトロセルロース膜）の作製

実施例 1<5>に記載した方法に準じて、hCG を認識するウサギ多クローン性抗体 SE030（持田製薬社製）をポアサイズ 5 $\mu$ m のニトロセルロース膜（アドバンテック東洋社製）に不溶化し、抗体不溶化流路 62 とした。

【0166】<6>特異結合分析装置の作製

このようにして作製した各部位を用い、下記のようにして、図 2 および図 3 に示される特異結合分析装置を各種作製した。まず、アクリル製の下部基板 66 上に吸収部 64（過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体）を積層した。なお、吸収部中央には、メンディングテープ（住友スリーエム株式会社製）からパンチングして作製した直径 6mm のシールを貼り付けた。次いで、抗体不溶化流路 62（抗 hCG 抗体（SE030）不溶化多孔性ニトロセルロース膜）をシール部 64a を有する吸水部ろ紙の上に中心位置を合わせて重積した。さらに、電極部 60a を貫通孔 68 の中心を抗体不溶化流路 62 の中心と一致して、作用極側を下にして電極部 60 を積層し、ガラス繊維ろ紙（GA55、アドバンテック東洋株式会社製）からパンチングして作製した直径 3mm の円形ろ紙を、電極の貫通孔にはめ込んで連通部 58 とした。次に、第 2 含浸部 56（電子メディエータ含浸部）を、その中心が電極の貫通孔の中心と一致するように重積した。この第 2 含浸部 56 の上部表面中央に、メンディングテープからパンチングして作製した直径 6mm のシールを貼り付けた。その上に、第 1 含浸部 54（信号物質発生体含浸部）を重積した。さらにその上に、界面活性剤処理をしたエルタス（カタログ番号 A05070、旭化成社製）からパンチングして作製した直径 12mm の



円形部材を重積してフィルター一部52とした。その上に、直径6mmの試料導入口50aを有するアクリル製の上部カバー50を、その試料導入口50aの中心が貫通孔68の中心と一致するように上乗せし、上部カバー50と下部基板66の四隅のネジ孔を合わせネジ留めして図2および3に示されるような、hCG濃度測定用の特異結合分析装置を作製した。

【0167】<7>ヘパリン血漿中でのhCG測定  
このようにして作製した特異結合分析装置の電極部60aにおいて、対極70を対極・参照極としてその端子70aを2チャンネル同時測定用のμ-PGS10ポテンシオスタット/ガルバノスタット(Teknologue社製)の対極(参照極)端子に接続し、同機器のチャンネル1およびチャンネル2の作用極端子に、それぞれ第1作用極76(検出部1)および第2作用極78(検出部2)の端子76aおよび78aをそれぞれ接続した。そして、同機器からGPIBラインを通じてコンピュータに接続し、計測およびデータ処理を行った。他方、ヘパリン添加健康男性血漿3検体(A)、(B)および(C)を用い、標準hCGを添加してそれぞれ、hCG 600IU/L

表 4

hCG濃度(IU/L)	血漿検体間の直線回帰式
600	$I_2 = -1.40 \times 10^{-1} I_1 - 8.82 \times 10^{-1}$
700	$I_2 = 6.57 \times 10^{-8} I_1 - 8.89 \times 10^{-1}$
900	$I_2 = 2.66 \times 10^{-1} I_1 - 8.71 \times 10^{-1}$

【0170】この場合、切片はhCG濃度にほとんど依存せず(ほぼ $-8.8 \times 10^{-1}$ )、傾きがhCG濃度に依存していた。 $I_1$ に対する $I_2$ の関係は下記の1式で表される。なお、式中Sは、上表の傾きであり、これがhCG濃度の関数である。

$$S = 1.36 \times 10^{-3} C - 0.95$$

2式(CとSの関係式)を1式( $I_1$ と $I_2$ の関係式)に代入して、 $I_1$ および $I_2$ の複数検出部の電流値から

$$C = \frac{I_2 + 0.88}{1.36 \times 10^{-3} I_1} + 6.99 \quad \text{3式}$$

【0172】(9)結果2. 単数検出部からhCG濃度を算出する関係式の導出(対照実験)  
単数作用極系の場合、つまり抗hCG抗体不溶化多孔性ニトロセルロース膜内での特異結合反応の分布を1カ所の検出部だけで測定しhCGを定量した場合に算出される各検体のhCG濃度を求めた。すなわち、 $I_1$ のみで

$$C = \frac{I_1 + 1.26}{3.22 \times 10^{-3}} \quad \text{4式}$$

【0173】(10)結果3. 結果1と結果2の比較  
複数検出部測定および単数検出部測定から導出された関

U/L、hCG 700IU/LおよびhCG 900IU/Lのヘパリン血漿検体を調製した。このようにして調製したhCGを含む各ヘパリン血漿検体を、特異結合分析装置の上部カバー50の試料導入口50aを通じて、それぞれ250μlずつ分析装置に導入した。試料導入後、各作用極を対極・参照極に対して-150mVとなるように電位設定し、電流値を記録した。

【0168】<8>結果1. 複数検出部の電流値からhCG濃度を算出する内部関係式の導出  
3種のヘパリン血漿検体(A)、(B)および(C)を用いて調製した各濃度のhCG溶液を導入した際の第1作用極76および第2作用極78で測定された電流値の6~8分間の平均値(それぞれ $I_1$ および $I_2$ )を図13に示す。また、各hCG濃度での $I_1$ に対する $I_2$ の関係を図14に示す。図14に示されるように各hCG濃度における $I_1$ に対する $I_2$ には直線関係が認められたため、その血漿検体間の直線回帰式を求めた。下記表4に得られた直線回帰式を示す。

【0169】

$$I_2 = S I_1 - 8.8 \times 10^{-1} \quad \text{1式}$$

【0171】以上の結果より、図15に示すようにhCG濃度Cと1式の傾きS間に直線関係を仮定し、その直線回帰式(下記2式)を求めて、hCG濃度(C)に対する傾き(S)の関係を導いた。

$$hCG \text{ 濃度を求める内部関係式 (3式) を導いた。}$$

hCGを定量する場合、hCG濃度に対する $I_1$ の関係は図16に示すように直線関係が認められたため、直線回帰を行い、この回帰式を基にして単数検出部の電流値 $I_1$ からhCG濃度を求める関係式(下記4式)を導いた。

係式(上記3式および4式)にそれぞれの電流値を代入し、hCG濃度を算出して比較した。結果を下記表5に

示す。

表 5 【0174】

		複数検出部測定結果	単数検出部測定結果
	hCG (IU/L)	定量値 (IU/L)	定量値 (IU/L)
検体A	600	644	392
	700	669	757
	900	836	882
検体B	600	543	612
	700	746	795
	900	923	1044
検体C	600	564	484
	700	703	624
	900	890	747

【0175】この結果から、両測定間の各hCG濃度の  
平均値およびCV値を比較した。結果を下記表6に示す。

表 6 【0176】

hCG (IU/L)	複数検出部測定		単数検出部測定	
	平均値 (IU/L)	CV (%)	平均値 (IU/L)	CV (%)
600	594	12.0	496	22.3
700	706	5.5	725	12.4
900	883	5.0	891	16.7

上記表6に示されるように、単数検出部測定で得られた  
I<sub>1</sub>のみを用いてhCGの定量を行った場合には検体中  
の夾雑物の影響を反映してそのCV値は大きかった。そ  
れに比して、複数検出部測定で得られたI<sub>1</sub>およびI<sub>2</sub>  
を用いてhCGの定量を行った場合には、それぞれCV  
値（変動係数）が12%以下であり検体間の測定誤差要  
因に対する補正効果が明瞭に認められた。従って、同じ  
分析操作でも、複数検出部を用いた分析手法は、単数検  
出部を用いた分析手法に比べて著しく測定精度が向よ  
した。

#### 【0177】[実施例3]

特異結合分析装置を用いたhCG濃度の測定

【0178】<1>第1含浸部54（信号物質発生体－  
電子メディエータ含浸部＝西洋わさびパーオキシダー  
ゼ標識抗hCGβ抗体およびN, N, N', N'－テトラ  
キス－（2'－ヒドロキシエチル）－p－フェニレンジ  
アミン2塩酸塩（THEPD）を含浸させた乾燥体）の

作製

前記実施例1の<1>で作製した西洋わさびパーオキシ  
ダーゼ標識抗hCGβ抗体およびTHEPD（最終濃度  
5mM）を、5%正常ウサギ血清（NRS）－10%サ  
ッカロース／0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩  
衝液 pH6.0にて希釈した溶液を調製した。次い  
で、前記実施例2の<1>で作製したTween 20処  
理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径12  
mmの円形濾紙に、上記溶液を140μl点着して凍結  
乾燥を行い、第1含浸部54（信号物質発生体－電子メ  
ディエータ含浸部）を作製した。

【0179】<2>吸収部64（過酸化水素・尿素を含  
浸させた乾燥体）の作製

クロマトグラフ濾紙（17 Chr、Whatman 社製）か  
らパンチングして作製した直径12mmの円形ろ紙に、  
前記実施例2の<4>で作製した1.0M過酸化水素－  
1.0M尿素溶液を100μl点着し、凍結乾燥を行

い、過酸化水素-尿素の乾燥体を作製した。

#### 【0180】<3>特異結合分析装置の作製

このようにして作製した各部位を用い、下記のようにして、図2および図3に示される特異結合分析装置を各種作製した。まず、アクリル製の下部基板66上に吸収部64（過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体）を積層した。なお、吸収部中央には、メンディングテープ（住友スリーエム株式会社製）からパンチングして作製した直径6mmのシールを貼り付けた。次いで、前記実施例2の<5>で作製した抗体不溶化流路62（抗hCG抗体（SE030）不溶化多孔性ニトロセルロース膜）をシール部64aを有する吸水部ろ紙の上に中心位置を合わせて重積した。さらに、【電極部の作製】の項で作製した電極部60aを貫通孔68の中心を抗体不溶化流路62の中心と一致して、作用極側を下にして電極部60aを積層し、ガラス繊維ろ紙（GA55、アドバンテック東洋株式会社製）からパンチングして作製した直径3mmの円形ろ紙を、電極の貫通孔にはめ込んで連通部58とした。次に、実施例2の<1>で作製した界面活性剤（Tween20）処理ガラス繊維濾紙を、その中心が電極の貫通孔の中心と一致するように重積し第2含浸部56とした。この第2含浸部56の上部表面中央に、メンディングテープからパンチングして作製した直径6mmのシールを貼り付けた。その上に、第1含浸部54（信号物質発生体-電子メディエータ含浸部）を重積した。さらにその上に、界面活性剤処理をしたエルタス（カタログ番号A05070、旭化成社製）からパンチングして作製した直径12mmの円形部材を重積してフィルター部52とした。その上に、直径6mmの試料導入口50aを有するアクリル製の上部カバー50を、その試料導入口50aの中心が貫通孔68の中心と一致するように上乗せし、上部カバー50と下部基板66の四隅のネジ孔を合わせネジ留めして図2および3に示され

$$P = 5.99 \times 10^{-6} C^2 - 3.52 \times 10^{-3} C - 7.59 \times 10^{-2} \quad 5 \text{式}$$

この式5からhCG濃度（C）を求める内部関係式を導

$$3.52 \times 10^{-3} - (1.42 \times 10^{-5} + 2.40 \times 10^{-5} \times P)^{1/2}$$

C=

$$1.2 \times 10^{-5}$$

6式

【0183】<6>結果2. 単数検出部からhCG濃度を算出する関係式の導出1（対照実験）

単数作用極系で抗体不溶化流路62（抗hCG抗体不溶化多孔性ニトロセルロース膜内）での特異結合反応の分布を測定しhCGを定量した場合（I<sub>1</sub>もしくはI<sub>2</sub>のみでhCGを定量）に算出される各検体のhCG濃度

$$I_1 + 1.10$$

C=

$$-4.05 \times 10^{-8}$$

I<sub>2</sub>のみでhCGを定量する場合

るような、hCG濃度測定用の特異結合分析装置を作製した。

#### 【0181】<4>ヘパリン血漿中でのhCG測定

このようにして作製した特異結合分析装置の電極部60aにおいて、対極70を対極（参照極）として2チャンネル同時測定用のμ-PGS10ポテンショスタット／ガルバノスタット（Teknologue社製）の参照極端子および対極（参照極）端子に接続し、同機器のチャンネル1およびチャンネル2の作用極端子に、それぞれ第1作用極76（検出部1）および第2作用極78（検出部2）の端子76aおよび78aを接続した。そして、同機器からGPIBラインを通じてコンピュータに接続し、計測およびデータ処理を行った。他方、ヘパリン添加健常男性血漿3検体（A）、（B）および（C）を用い、標準hCGを添加してそれぞれ、hCG 50IU/L、hCG 100IU/LおよびhCG 200IU/Lのヘパリン血漿検体を調製した。このようにして調製したhCGを含む各ヘパリン血漿検体を、特異結合分析装置の上面カバー50の試料導入口50aを通じて、それぞれ250μlずつ分析装置に導入した。試料導入後、各作用極を対極・参照極に対して-150mVとなるように電位設定し、電流値を記録した。

【0182】<5>結果1. 複数検出部からhCG濃度を算出する内部関係式の導出1

ヘパリン血漿3検体（A）、（B）および（C）を用いて調製した各濃度のhCG溶液を点着した際の第1作用極76および第2作用極78で測定された電流値の8～10分間の平均値（I<sub>1</sub>およびI<sub>2</sub>）を図17に示す。さらに、各hCG濃度でのI<sub>1</sub>からI<sub>2</sub>を差し引いた内部パラメーター（P=I<sub>1</sub>-I<sub>2</sub>）の関係を図18に示す。各検体での各hCG濃度（C）に対するPとの相関から、内部パラメーターPとhCG濃度Cとの関係式を求めた（下記5式）。

いた（下記6式）。

（C）を求めた。ここでは、I<sub>1</sub>のみでhCGを定量する場合はhCG濃度に対するI<sub>1</sub>の相関（図19）から、I<sub>2</sub>のみでhCGを定量する場合はhCG濃度に対するI<sub>2</sub>の相関（図20）からhCG濃度（C）を算出する関係式を求めた。（7式および8式）。I<sub>1</sub>のみでhCGを定量する場合

7式

$$C = \frac{I_2 + 9.91 \times 10^{-1}}{-1.82 \times 10^{-3}} \quad \text{8式}$$

【0184】複数検出部測定および単数検出部測定から導出された関係式（6式、7式および8式）にそれぞれの電流値を代入してhCG濃度を算出し、各測定間のh

CG濃度の平均値およびCV値を比較した。結果を下記表7に示す。

表 7

hCG (IU/L)	複数検出部		単数検出部 (I <sub>1</sub> )		単数検出部 (I <sub>2</sub> )	
	平均値 (IU/L)	CV(%)	平均値 (IU/L)	CV(%)	平均値 (IU/L)	CV(%)
50	47	28	62	210	73	371
100	113	32	133	78	140	135
200	196	27	181	73	174	152

上記表7に示されるように、単数検出部測定で得られたI<sub>1</sub>およびI<sub>2</sub>単独の値を用いてhCGの定量を行った場合、CV値はかなり大きく検体間の測定誤差要因を補正できておらず、測定値には全く信頼性がなかった。それに比して、複数検出部測定で得られたI<sub>1</sub>およびI<sub>2</sub>の両者を用いてhCGの定量を行った場合には、分析操作は同じであるにもかかわらず、各hCG濃度の読み値のCV値が顕著に減少し、充分な補正効果が示された。

【0185】<7>結果3. 複数検出部からhCG濃度を算出する内部関係式の導出2

前述のヘパリン血漿3検体（A）、（B）、および

（C）を用いて調製した各濃度のhCG溶液の測定において、第1作用極76および第2作用極78で測定され

$$C = \frac{5.50 \times 10^{-3} - (4.07 \times 10^{-5} - 3.43 \times 10^{-5} Q)^{1/2}}{1.71 \times 10^{-5}} \quad \text{9式}$$

【0186】<8>結果4. 単数検出部からhCG濃度を算出する関係式の導出2.

単数検出部で同様に測定を行い、hCGを定量した場合（D<sub>1</sub>もしくはD<sub>2</sub>のみでhCGを定量）に算出される各検体のhCG濃度（C）を求めた。ここで、D<sub>1</sub>のみ

$$C = \frac{D_1 + 8.73}{-3.23 \times 10^{-2}} \quad \text{10式}$$

D<sub>2</sub>のみでhCGを定量する場合

$$C = \frac{D_2 + 4.51}{-8.28 \times 10^{-3}} \quad \text{11式}$$

【0187】複数検出部測定および単数検出部測定から導出された関係式（9式、10式および11式）にそれぞれの電流密度を代入し、hCG濃度を算出し、各測定

間8～10分間の電流値の平均（I<sub>1</sub>およびI<sub>2</sub>）より、電流密度（電流値/各電極面積（μA/cm<sup>2</sup>））の平均値D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>を求めた。各hCG濃度でのD<sub>1</sub>からバックグラウンド（-1.5 μA/cm<sup>2</sup>）を差し引いた値を、D<sub>2</sub>からバックグラウンド（-0.2 μA/cm<sup>2</sup>）を差し引いた値で割り、さらにその値から定数1.3を差し引いた内部パラメータQと、hCG濃度との関係を図21に示す。図21に示される各hCGの濃度（C）に対する

Q = [(D<sub>1</sub> + 1.5) / (D<sub>2</sub> + 0.2)] - 1.3との相関から、hCG濃度を算出する内部関係式を求めた（9式）。

でhCGを定量する場合はhCG濃度に対するD<sub>1</sub>の相関から、D<sub>2</sub>のみでhCGを定量する場合はhCG濃度に対するD<sub>2</sub>の相関からhCG濃度（C）を算出する関係式を求めた（下記10式および11式）。

D<sub>1</sub>のみでhCGを定量する場合

間の各hCG濃度の平均値およびCV値を比較した。結果を下記表8に示す

【0188】

表 8

hCG (IU/L)	複数検出部		単数検出部 (D <sub>1</sub> )		単数検出部 (D <sub>2</sub> )	
	平均値 (IU/L)	CV(%)	平均値 (IU/L)	CV(%)	平均値 (IU/L)	CV(%)
50	55	9	61	210	73	372
100	110	11	132	78	139	136
200	196	45	180	72	173	153

【0189】上記表8に示されるように、内部関係式9式を用いたhCGの定量(複数検出部)は、内部関係式6式を用いた場合(表7)と同様に、単数検出部測定に対し明らかな補正効果を示し、これらの式によって検体中の英雄物質の影響が補正されることが明かとなった。

【0190】[実施例4]第1含浸部54(信号物質発生体-電子メディエータ含浸部)として、西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗hCGβ抗体の失活度が異なる3種のもの(A)、(B)および(C)を用いた以外は、  
20 前記実施例3と全く同様にして特異結合分析装置(特異結合分析装置(A)、(B)および(C)とする)を3種作製し、実施例3と同様にヘパリン血漿中のhCG測

定(hCG 200IU/LおよびhCG 400IU/L)を行った。

【0191】<結果>パーオキシダーゼ活性の失活度が異なる西洋わさびパーオキシダーゼ抗hCGβ抗体を含まれた第1含浸部54を用いた特異結合分析装置

(A)、(B)および(C)による測定結果より、前記実施例3の<7>および<8>と同様に、電流密度の4~5分間の平均値D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>を求めて、複数検出部測定および単数検出部測定(D<sub>1</sub>)から導出された関係式にそれぞれ代入し、hCG濃度を算出した。結果を下記表9に示す。

【0192】

表 9

hCG 200 IU/Lを添加した試料の定量hCG濃度		
標識抗体	複数検出部測定 (IU/L)	単数検出部測定 (IU/L)
(A)	210	30
(B)	240	40
(C)	170	定量不可能
hCG 400 IU/Lを添加した試料の定量hCG濃度		
標識抗体	複数検出部測定 (IU/L)	単数検出部測定 (IU/L)
(A)	370	280
(B)	370	310
(C)	420	180

以上のように、複数検出部測定から導出された内部関係式を用いて、酵素標識抗体の酵素の失活を補正できた。

【0193】[実施例5]前記実施例3と同様の特異結合分析装置を作製し、これをConstant Temperature Testing Chambers model IV 21(ヤマト科学社製)内で測定を行い、25℃および40℃でのヘパリン血漿中のhCG測

定(hCG 400IU/L)を行った。

【0194】前記実施例3の<7>および<8>と同様に、電流密度の4~5分間の平均値D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>を求めて、複数検出部測定および単数検出部測定(D<sub>1</sub>)から導出された関係式にそれぞれ代入し、hCG濃度を算出した。結果を下記表10に示す。

【0195】

表 10

温 度 (℃)	複数検出部測定 (IU/L)	単数検出部測定 (D <sub>1</sub> ) (IU/L)
25	400	400
40	400	550

以上のように、複数検出部測定から導出された内部関係式を用いて、温度による効果を補正できた。

#### 【0196】〔実施例6〕

特異結合分析装置を用いた全血中のhCG濃度の測定

【0197】＜1＞第1含浸部54（信号物質発生体—電子メディエータ含浸部＝西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗hCGβ抗体およびN, N, N', N'-テトラキス（2'-ヒドロキシエチル）-p-フェニレンジアミン2塩酸塩（THEPD）を含浸させた乾燥体）の作製

前記実施例1の＜1＞で作製した西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗hCGβ抗体およびTHEPD（最終濃度2mM）を、5%正常ウサギ血清（NRS）—10%サッカロース／0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 pH6.0にて希釈した溶液を調製した。次いで、前記実施例2の＜1＞で作製したTween20処理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径12mmの円形濾紙に、上記溶液を140μl点着して凍結乾燥を行い、第1含浸部54（信号物質発生体—電子メディエータ含浸部）を作製した。

【0198】＜2＞第2含浸部56（緩衝液成分含浸部＝0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 pH6.0を含浸させた乾燥体）の作製

0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 pH6.0を調製し、前記実施例2の＜1＞で作製したTween20処理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径12mmの円形濾紙に上記溶液を140μl点着し、凍結乾燥を行い、緩衝液成分の乾燥体を作製した。

【0199】＜3＞抗体不溶化流路62（抗体不溶化メンブレン＝抗hCG抗体不溶化多孔性セルロース混合エステル膜）の作製

hCGを認識するウサギ多クローン性抗体SE030（持田製薬社製）をPBSに溶解して6.4mg/mL濃度に調製した溶液30μlを、シャーレ上にて、ポアサイズ8.0μmのセルロース混合エステル多孔性膜（カタログ番号SCWP0190R、日本ミリポア社製）からパンチングして作製した直径16mmの円形多孔性膜に中央部分から浸潤させた。デシケータ内で室温で2時間乾燥後、直径13mmのサイズにパンチングし、抗体不溶化流路62（抗hCG抗体（SE030）不溶化多孔性セルロース混合エステル膜）を作製した。

#### 【0200】＜4＞特異結合分析装置の作製

このようにして作製した各部位を用い、下記のようにして、図2および図3に示される特異結合分析装置を各種作製した。まず、アクリル製の下部基板66上に前記実施例3で作製した吸収部64（過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体）を積層した。なお、吸収部中央には、メンディングテープ（住友スリーエム株式会社製）からパンチングして作製した直径8mmのシールを貼り付けた。次いで、抗体不溶化流路62（抗hCG抗体（SE030）不溶化多孔性ニトロセルロース膜）をシール部64aを有する吸水部ろ紙の上に中心位置を合わせて重積した。さらに、電極部60aを貫通孔68の中心を抗体不溶化流路62の中心と一致して、作用極側を下にして、電極部60aを積層し、ガラス繊維ろ紙（GA55、アドバンテック東洋株式会社製）からパンチングして作製した直径3mmの円形ろ紙を、電極の貫通孔にはめ込んで連通部58とした。次に、第2含浸部56（緩衝液成分含浸部）を、その中心が電極の貫通孔の中心と一致するように重積した。この第2含浸部56の上部表面中央に、メンディングテープからパンチングして作製した直径6mmのシールを貼り付けた。その上に、第1含浸部54（信号物質発生体—電子メディエータ含浸部）を重積した。さらにその上に、界面活性剤処理をしたエルタス（カタログ番号A05070、旭化成社製）からパンチングして作製した直径12mmの円形部材を重積してフィルター部52とした。その上に、直径6mmの試料導入口50aを有するアクリル製の上部カバー50を、その試料導入口50aの中心が貫通孔68の中心と一致するように上乗せし、上部カバー50と下部基板66の四隅のネジ孔を合わせネジ留めして図2および図3に示されるような、hCG濃度測定用の特異結合分析装置を作製した。

#### 【0201】＜5＞ヘパリン全血中でのhCG測定

このようにして作製した特異結合分析装置の電極部60aにおいて、対極70を対極・参照極として電流計測回路の対極（参照極）端子に接続し、同回路のチャンネル1およびチャンネル2の作用極端子に、それぞれ第1作用極76（検出部1）および第2作用極78（検出部2）の端子76aおよび78aを接続した。そして、同回路からナショナルインスツルメンツ社製のデータ集録ボードAT-MIO-16Xを通じてコンピュータ内にデータを取り込み解析を行った。ペノジェクトII真空探



血管（テルモ社製）にて採血したヘパリン添加健康男性全血4検体（A）、（B）、（C）および（D）に標準hCGを添加して検体（A）については、hCG 50 IU/L、およびhCG 100 IU/L、検体（B）および（C）については、hCG 25 IU/L、hCG 50 IU/L、およびhCG 75 IU/L、そして検体（D）についてはhCG 50 IU/Lのヘパリン全血検体を調製した。hCGを含む各ヘパリン全血検体をそれぞれ、特異結合分析装置の上面カバー50板の試料導入口50aを通じて、試料導入部に250μl導入した。試料導入後、各作用極を対極・参照極に対して-150mVとなるように電位設定し、電流値を記録した。

【0202】<6>マイクロタイタープレートを用いた酵素免疫測定による各血液検体中のhCG濃度測定  
全血にhCGを添加した場合、hCGは血漿成分に溶解していると考えられるため、hCG添加濃度と実濃度とは異なり、ヘマトクリット値による補正が必要である。そこで、全血にhCGを添加した全血検体の血漿分離を行い、血漿成分中に存在しているhCGを以下に示す酵素免疫測定法により定量しhCGの実濃度とした。NUNC-IMMUNO PLATE（NUNC社製）にPBSで10μg/mLに調製したhCGを認識するウサギ多クローン性抗体SE030を50μL加え、56℃で30minインキュベイトした。イオン交換水で洗浄後、PBSで0.5%に調製したBSA溶液を100μL加え、室温で1.5時間インキュベイトしてブロッキングを行った。BSA溶液を除去した後、ヘパリン血漿で0、10、20、50、100、および200 IU/Lに希釈した標準hCG検体、およびhCG添加全血検

$$C = \frac{-4.83 \times 10^{-9} + (2.28 \times 10^{-5} + 2.21 \times 10^{-5} \times Q)^{1/2}}{1.10 \times 10^{-5}}$$

$$1.10 \times 10^{-5}$$

12式

【0204】次いで、12式にヘパリン全血hCG検体（B）、（C）および（D）のQ値を代入し、hCG濃度を算出し、<6>に示される酵素免疫測定法によって求めた全血中hCGの実濃度との相関を求めた。その結果、図24に示すように、両者には優れた相関性があり、複数電極による補正の効果が顕著に示された。

#### 【0205】【実施例7】

特異結合分析装置を用いた全血試料中のE2濃度の競合法による測定

【0206】<1>抗E2抗体と西洋ワサビパーオキシダーゼとの結合体（信号物質発生体）の作製

E2を認識するマウス単クローン性抗体F815（持田製薬社製）を100mM 塩化ナトリウム-1mM EDTA-60mM トリエタノールアミン緩衝液（pH 8.0）（TEA緩衝液）に5.3mg/mL濃度となるように溶解し、窒素ガス置換したTEA緩衝液に十分

体から遠心分離操作で得られたヘパリン血漿検体を50μL加え、室温にて1時間反応させた。反応後、洗浄液で5回、イオン交換水で2回洗浄した後、0.1%BSA-0.1M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液pH6.0にて希釈した西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗hCGβ抗体（HRPO-HM81）を50μL添加し、室温で1時間反応させた。反応後、洗浄液で5回、イオン交換水で2回洗浄した後、TMB Soluble Reagent（Scy Tck社製）を50μL添加し、酵素反応による呈色反応を15min行なった。次いで、TMB Stop Buffer（Scy Tck社製）を100μL加え、酵素反応を停止した。その後、分光光度計ETY96（東洋測器社製）にて吸光度を測定し、標準hCGのスタンダードカーブから各ヘパリン血漿中のhCG実濃度を求めた。

【0203】<7>結果. 複数検出部からhCG濃度を算出する内部関係式の導出  
ヘパリン全血検体（A）を用いて調製した各実濃度のhCG溶液を点着した際の第1作用極76および第2作用極78で測定された10～12分間の電流値の平均値I<sub>1</sub>およびI<sub>2</sub>から、電流密度の平均値（D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>）を算出した。hCG実濃度と電流密度との関係を図22に示す。また、各hCG濃度でのD<sub>1</sub>からバックグラウンド値（-23μA/cm<sup>2</sup>）を差し引き、さらにD<sub>2</sub>で割った内部パラメーターQを算出した。hCG実濃度と内部パラメーターQとの関係を図23に示す。図23に示される各hCG実濃度（C）に対するQ=（D<sub>1</sub>+23）/D<sub>2</sub>との相関から、hCG濃度を算出する内部関係式を求めた（下記12式）。

に透析した。この抗体溶液2.2mLに対して、TEA緩衝液中に調製した50mMの2-イミノチオラン塩酸塩（Pierce社製）溶液70μLを添加し、攪拌後、窒素ガス雰囲気下、4℃で1.5時間静置した。その後、窒素ガス置換した100mM塩化ナトリウム-1mM EDTA-100mM リン酸緩衝液（pH6.0）（EDTA-PB）で十分に透析し、SH基が導入された抗E2抗体を得た。100mM 塩化ナトリウム-100mMリン酸緩衝液（pH6.0）（PB）で20mg/mL濃度に調製された西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRPO、東洋紡社製）溶液3.1mLを30℃でゆっくり攪拌しながら、50mMのスルホSMCC（Pierce社製）3.1mLを添加して20分間反応させた。反応後、窒素ガス置換したPBで平衡化したSephadex G-25（ファルマシア社製）カラム（2.5φ×14.5cm）を通して未反応のスルホSMCCを除去

し、濃縮器CENTRIPREP-10 (Amicon社製)を用いて濃縮し、マレイミド化HRPOを得た。得られたマレイミド化HRPOの濃度は、403nmの吸光度から求めた。3. 3×10<sup>-7</sup>モルのマレイミド化HRPO溶液に対して、1/5倍モル量のSH基導入F815抗体を添加混合後、窒素ガス雰囲気下、4℃にて16時間反応させた。次いで、500mMのシステアミン-E DTA-PB溶液96μLを添加し、窒素ガス雰囲気下、4℃にて60分間反応させ、その後、窒素ガス置換したPBで平衡化したULTROGEL AcA34 (IBF Biotechnics 社製) カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。280nmおよび403nmにおける吸光度測定を、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出分画について行い、遊離の酵素を含まないF815抗体とHRPOとの結合体の分画を集めて濃縮した。濃縮標品 (HRPO-F815抗体と称す) は、Phastシステムによる電気泳動 (ファルマシア社製) で分子量を確認後、吸光度と酵素活性から含有される抗体および酵素量を決定し、後記する測定において信号物質発生体として用いた。

【0207】<2>6-ケトエストラジオール 6- (O-カルボキシメチル) オキシム-ウシγグロブリン (E2-6CMO-γG) の作製

E2-6CMO (シグマ社製) 6.6mgをジオキサン0.66mLに溶解し、トリ-n-ブチルアミン (和光純薬製) 4.62μL、およびイソブチルクロロホルメート (ナカライテスク社製) 4.62μLを加え、10℃で30min攪拌した。次いで、この溶液をあらかじめ50%ジオキサン水溶液で5mg/mLに調製したウシγグロブリン (シグマ社製) 溶液30.32mLに添加した。その後、0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて反応溶液のpHを8.0~8.5に調節しながら10℃で4時間攪拌した。蒸留水に対し4℃で20時間透析した後、反応溶液に等量のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、エーテル層を除去した。この抽出操作を二度繰り返し、溶液中の未反応E2-6CMOを充分除去した後、水層をPBに対して透析を行い、E2-6CMO-γGを作製した。

【0208】<3>第1含浸部54 (信号物質発生体-電子メディエータ含浸部=西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗E2抗体およびN, N, N', N'-テトラキス- (2'-ヒドロキシエチル) -p-フェニレンジアミン2塩酸塩 (THEPD) を含浸させた乾燥体) の作製  
先に<1>項で作製した西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗E2抗体 (HRPO-F815抗体)、およびTHEPD (最終濃度2mM)、5%正常ウサギ血清 (NRS) -10%ラクトース/0.1M NaCl含有0.01Mリン酸緩衝液 pH7.4にて希釈した溶液を調製した。次いで、実施例2の<1>で作製したTwee

n20処理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径10mmの円形濾紙に上記溶液を90μL点着し、凍結乾燥を行い、第1含浸部54 (信号物質発生体-電子メディエータ含浸部) を作製した。

【0209】<4>第2含浸部56 (緩衝液成分含浸部=0.1M NaCl含有0.01Mリン酸緩衝液 pH7.4を含浸させた乾燥体) の作製

0.1M NaCl含有0.01Mリン酸緩衝液 pH7.4を調製し、前記実施例2の<1>で作製したTwee n20処理ガラス繊維濾紙からパンチングして作製した直径10mmの円形濾紙に上記溶液を90μL点着し、凍結乾燥を行い、緩衝液成分の乾燥体を作製した。

【0210】<5>抗原不溶化流路62 (ハプテン不溶化メンブレン=E2-6CMO-γG不溶化多孔性セルロース混合エステル膜) の作製

先に<2>で作製したE2-6CMO-γGをPBSに溶解して2.0mg/mL濃度に調製した。この溶液100mLに、ポアサイズ8.0μmのセルロース混合エステル多孔性膜 (日本ミリポア社製) からパンチングして作製した直径11mmの円形多孔性膜1000枚をビーカー内で浸漬し、30分間25℃で振とうした。濾紙で水分をぬぐった多孔性膜を一晩真空乾燥して抗原不溶化流路62 (ハプテン不溶化メンブレン) を作製した。

【0211】<6>吸収部64 (過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体) の作製

クロマトグラフ濾紙 (31ET, Whatman 社製) からパンチングして作製した直径10mmの円形ろ紙に、前記実施例2の<4>と同様に作製した2.0M過酸化水素-4.0M尿素溶液を30μL点着し、凍結乾燥を行い、過酸化水素-尿素の乾燥体を作製した。

【0212】<7>特異結合分析装置の作製

このようにして作製した各部位を用い、下記のようにして、図2および図3に示される特異結合分析装置を各種作製した。まず、アクリル製の下部基板66上に吸収部64 (過酸化水素・尿素を含浸させた乾燥体) を積層した。なお、吸収部64の中央には、メンディングテープ (住友スリーエム株式会社製) からパンチングして作製した直径8mmのシールを貼り付けた。次いで、抗原不溶化流路62 (ハプテン不溶化メンブレン) をシール部64aを有する吸水部ろ紙の上に中心位置を合わせて重積した。さらに、電極部60と貫通孔68の中心を抗原不溶化流路62の中心と一致させて、作用極側を下にして積層した。次に、第2含浸部56 (緩衝液成分含浸部) を、その中心が電極の貫通孔の中心と一致するように重積した。この第2含浸部56の上部表面中央に、メンディングテープからパンチングして作製した直径8mmのシールを貼り付けた。その上に、第1含浸部54 (信号物質発生体-電子メディエータ含浸部) を重積した。さらにその上に、界面活性剤処理をしたアクスター (カタログ番号B50401、東レ社製) からパンチングして作製した直径10mmの円形部材を重積してフィ

ルター部 52 とした。その上に、直径 6 mm の試料導入口 50 a を有するアクリル製の上部カバー 50 を、その試料導入口 50 a の中心が貫通孔 68 の中心と一致するように上乗せし、上部カバー 50 下部基板 66 の四隅のネジ孔を合わせネジ留めして図 2 および 3 に示されるような、エストラジオール濃度測定用の特異結合分析装置を作製した。

【0213】<8>ヘパリン全血中での E2 測定

このようにして作製した特異結合分析装置の電極部 60 g において、対極 70 を対極・参照極として電流計測回路の対極（参照極）端子に接続し、同回路のチャンネル 1 およびチャンネル 2 の作用極端子に、それぞれ第 1 作用極 76（検出部 1）および第 2 作用極 78（検出部 2）の端子 76 a および 78 a を接続した。そして、同回路からナショナルインスツルメンツ社製のデータ集録ボード AT-MIO-16X を通じてコンピュータ内にデータを取り込み解析を行った。ベノジェクト II 真空採血管（テルモ社製）で採血したヘパリン添加健康常男性全血検体（A）に標準 E2 を添加して、E2 1 ng/mL、E2 3 ng/mL、E2 10 ng/mL、E2 30 ng/mL および E2 100 ng/mL のヘパリン全血検体を調製した。また、別の全血検体（B）および、（C）にも E2 を各種濃度で添加して測定試料とした。E2 を含む各ヘパリン全血検体をそれぞれ、前記特異結合分析装置の上面アクリル板の試料導入口を通じ

a1-d1

$$D_1 = \frac{a_1 - d_1}{1 + \{(\log C) / c_1\}^{-b_1}} + d_1 \quad 13式$$

$$D_1 + D_2 = \frac{a_2 - d_2}{1 + \{(\log C) / c_2\}^{-b_2}} + d_2 \quad 14式$$

各全血検体（A）、（B）および（C）から求めた応答曲線の近似式（13式および14式）中の b1、b2、c1 および c2 を比較したところ、これらの係数は b1 = b2 = 4.4 および c1 = c2 = 2.2 とすることが

$$d_1 = a_1 + 9.7 \quad 15式$$

$$d_2 = a_2 + 1.8 \quad 16式$$

$$a_2 = 1.1 \cdot a_1 - 1.5 \quad 17式$$

上記式（13式、14式、15式、16式および17式）より、試料に依存する係数 a1、d1、a2、d2 を消去することで、内部関係式 C = S (D1, D1 + D

$$C = 10^{\left[ 2.2 \times \exp \left( \frac{\ln \left( \frac{0.07D_1 - 1.2D_2 - 19}{-0.07D_1 + 1.2D_2 + 9.3} \right)}{4.4} \right) \right]} \quad 18式$$

【0216】<11>結果. 単数検出部から E2 濃度を算出する関係式の導出

単数検出部で同様に測定を行い、E2 を定量した場合

(D1 のみで E2 を定量) に算出される全血検体（A）

て、試料導入部に 150 μl 導入した。試料導入後、各作用極を対極・参照極に対して -150 mV となるように電位設定し、電流値を記録した。

【0214】<9>酵素免疫測定法による各血液検体中の E2 濃度測定

上記各全血検体から分離した血漿中の E2 濃度を市販のエストラジオール測定試薬エンチムンテスト E2（ペーリンガー・マンハイム社製）を用いて測定し、この濃度を各全血検体の E2 実濃度とした。

【0215】<10>結果. 複数検出部から E2 濃度を算出する内部関係式の導出

ヘパリン全血検体（A）、（B）および（C）を用いて調製した各濃度の E2 溶液を点着した際の第 1 作用極 76 および第 2 作用極 78 で測定された 8~10 分間の電流値の平均値 I1 および I2 から、電流密度の平均値 (D1 および D2) を算出した。ここでは、応答曲線の 1 つは各全血検体中の E2 実濃度と D1 との関係（図 25）から求めた近似式とした。また、もう一つの応答曲線は各全血検体中の E2 実濃度と、D2 の代わりに、D1 + D2 との関係（図 26）から求めた近似式とした。図 25 および図 26 に示されるように、各 E2 実濃度の対数値 (log C) に対する D1 および D1 + D2 の応答は、ロジスティック曲線（下記 13 式および 14 式）に適合した。ここで 13 式、14 式および 18 式中の E2 濃度 C は、10<sup>-1</sup> ng/mL 単位である。

できた。また、応答曲線の近似式（13式および14式）の a1 と d1、a2 と d2 および a1 と a2 の間には、下記 15 式、16 式および 17 式に示されるような関係が認められた。

$$d_1 = a_1 + 9.7 \quad 15式$$

$$d_2 = a_2 + 1.8 \quad 16式$$

$$a_2 = 1.1 \cdot a_1 - 1.5 \quad 17式$$

2) (18式) が誘導できる。

【数 1】

(B) (C) の E2 濃度 C を求めた。ここでは、全血検体（A）を用いた際の E2 濃度に対する D1 の応答から E2 濃度 C を算出する関係式を求めた。（下記 19 式）なお、19 式中の E2 濃度 C は 10<sup>-1</sup> ng/mL 単位で

ある。

【数 2】

$$C=10^{\left[2.2 \times \exp \left( \frac{\ln \left( \frac{-17-D_1}{D_1+7.3} \right)}{4.4} \right) \right]} \quad 19 \text{式}$$

複数検出部測定および単数検出部測定から誘導された関

表 11

試 料	E 2 3 ng/ml		E 2 10 ng/ml		E 2 30 ng/ml	
	複数検出部 (ng/ml)	単数検出部 (ng/ml)	複数検出部 (ng/ml)	単数検出部 (ng/ml)	複数検出部 (ng/ml)	単数検出部 (ng/ml)
全血 (B)	3	2	13	7	32	23
全血 (C)	3	1	9	7	24	20
平 均 値	3	2	11	7	28	22

表 11 に示されるように、複数検出部測定から誘導した内部関係式 18 式を用いた E 2 の測定は単数検出部測定から誘導した関係式 19 を用いた場合に比べ明かな補正効果を示した。ゆえにこの内部関係式 18 によって検体中の夾雑物質等の影響が補正されることが明かとなった。また、内部関係式 (18 式) から求めた E 2 濃度と < 9 > の酵素免疫測定法で求めた E 2 実濃度との間には良い相関が認められた。

【0218】 [実施例 8]

検定用血清試料による全血検体測定用内部関係式の装置ロット依存性定数項の決定

< 1 > 特異結合分析装置の作製

前記実施例 7 において用いた特異結合分析装置と同一ロットの装置を用い、以下の測定を行った。

【0219】 < 2 > 検定用血清試料中での E 2 測定

ステロイドフリー血清 (Scantibodies 社製) (検定用血清 A (非特異的因子が少ない全血検体に相当))、上記西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗 E 2 抗体および THEPD をそれぞれ、 $5 \times 10^{-10}$  M および  $1 \times 10^{-4}$  M を含むステロイドフリー血清 (検定用血清 B (非特異的因子が多い全血検体に相当))、および上記西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗 E 2 抗体および THEPD をそれぞれ、 $5 \times 10^{-11}$  M および  $1 \times 10^{-4}$  M を含むステロイドフリー血清 (検定用血清 C (非特異的因子が中程度の全血検体に相当)) に標準 E 2 を添加して、E 2 1 ng/mL、E 2 3 ng/mL、E 2 10 ng/mL、E 2 30 ng/mL および E 2

$$d1 = a1 + 9.7$$

$$d2 = a2 + 1.8$$

$$a2 = 1.1a1 - 1.5$$

上記式 (13 式、14 式、20 式、21 式および 22 式) より、試料に依存する係数 a1、d1、a2、d2 を消去することで、内部関係式  $C = T(D_1, D_1 + D_2)$

係式 (上記 18 式および 19 式) に全血検体 (B) および (C) の電流密度を代入し、全血検体 (B) および (C) の E 2 濃度をそれぞれ求め、その平均値を比較した。結果を表 11 に示す。

【0217】

【表 5】

100 ng/mL の各検定用血清検体を調製した。E 2 を含む各検定用血清検体をそれぞれ、前記特異結合分析装置の上面アクリル板の試料導入口を通じて、試料導入部に 150  $\mu$ L 導入した。試料導入後、各作用極を対極・参照極に対して -150 mV となるように電位設定し、電流値を記録した。

【0220】 < 3 > 結果. 検定用血清検体から E 2 濃度を算出する補正式の導出

検定用血清検体 (A)、(B) および (C) を用いて調製した各濃度の E 2 溶液を点着した際の第 1 作用極 76 および第 2 作用極 78 で測定された 5.5 ~ 7.5 分間 (全血検体測定の 8 ~ 10 分間に相当する) の電流値の平均値 I1 および I2 から、電流密度の平均値 (D1 および D2) を算出した。各 E 2 実濃度の対数値 (log C) に対する D1 および D1 + D2 の応答は、実施例 7 に記載した全血検体と同様にロジスティック曲線 (上記 13 式および 14 式) に適合した。ここで 13 式、14 式および 23 式中の E 2 濃度 C は  $10^{-1}$  ng/mL 単位である。各検定用血清試料 (A)、(B) および (C) から求めた応答曲線の近似式 (13 式および 14 式) の b1、b2、c1 および c2 を比較したところ、これらの係数は b1 = b2 = 4.4 および c1 = c2 = 2.2 とすることができた。また、応答曲線の近似式 (13 式および 14 式) の a1 と d1、a2 と d2 および a1 と a2 の間には下記 20 式、21 式および 22 式に示されるような関係が認められた。

20 式

21 式

22 式

2) (下記 23 式) が誘導できる。

【数 3】

$$C=10^{\left[2.2 \times \text{Exp} \left( \frac{\ln \left( \frac{0.07D_1 - 1.2D_2 - 19}{-0.07D_1 + 1.2D_2 + 9.3} \right)}{4.4} \right) \right]} \quad 23\text{式}$$

検定用血清検体から誘導された内部関係式 23 式の装置ロット依存性の定数項は、実施例 7 で全血検体から誘導された内部関係式 18 式の装置ロット依存性定数項と一致した。以上より検定用血清検体から得られた内部関係式を用いることで全血中の E 2 の定量が可能となった。

#### 【0221】

【発明の効果】以上詳細に説明したように、本発明の特異結合分析方法および装置によれば、未反応物の分離操作（洗浄操作）を行う必要がなく、汎用性に優れ、しかも、夾雑物による影響、試料が測定に与える非特異的な影響や反応温度などの分析環境、分析に用いている試薬の失活程度など測定値の信頼性を低下させる要因を排除して、高精度かつ迅速な測定が可能な特異結合分析方法、およびこの特異結合分析方法の実施に好適な特異結合分析装置を提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の特異結合分析方法を説明するための概念図である。

【図 2】 本発明の特異結合分析装置の概略分解斜視図である。

【図 3】 図 2 に示される特異結合分析装置を組み立てた際の概略断面図である。

【図 4】 (a) は図 2 に示される特異結合分析装置の電極部の上面、(b) は同電極部の裏面を、それぞれ示す概略図である。

【図 5】 (a) は図 2 に示される特異結合分析装置に用いられる 2 つの作用極を有する電極部の裏面の別の例を示す概略図、(b) はストリップ状の流路を用いた別の特異結合分析装置に用いられる 2 つの作用極を有する電極部の裏面の例を示す概略図である。

【図 6】 (a) は図 2 に示される特異結合分析装置に用いられる 3 つの作用極を有する電極部の裏面の別の例を示す概略図、(b) はストリップ状の流路を用いた別の特異結合分析装置に用いられる 3 つの作用極を有する電極部の裏面の例を示す概略図である。

【図 7】 hCG 濃度と複数の検出部によって測定された電流値との関係を示すグラフである。

【図 8】 hCG 濃度と複数の検出部によって測定された電流値との関係を示すグラフである。

【図 9】 hCG 濃度と複数の検出部によって測定された電流値との関係を示すグラフである。

【図 10】 hCG 濃度と複数の検出部によって測定された電流値との関係を示すグラフである。

【図 11】 hCG 濃度と複数の検出部によって測定された電流値との関係を示すグラフである。

【図 12】 hCG 濃度と複数の検出部によって測定さ

れた電流値との関係を示すグラフである。

【図 13】 hCG 濃度と電流値との関係を示すグラフである。

【図 14】 検出部 1 の電流値と検出部 2 の電流値との関係を示すグラフである。

10 【図 15】 hCG 濃度と傾き S との関係を示すグラフである。

【図 16】 hCG 濃度と検出部 1 による電流値との関係を示すグラフである。

【図 17】 hCG 濃度と電流値との関係を示すグラフである。

【図 18】 hCG 濃度と内部パラメータ P との関係を示すグラフである。

【図 19】 hCG 濃度と検出部 1 による電流値との関係を示すグラフである。

20 【図 20】 hCG 濃度と検出部 2 による電流値との関係を示すグラフである。

【図 21】 hCG 濃度と内部パラメータ Q との関係を示すグラフである。

【図 22】 hCG 濃度と電流密度との関係を示すグラフである。

【図 23】 hCG 濃度と内部パラメータ Q との関係を示すグラフである。

【図 24】 本発明の特異結合分析方法（装置）で求めた hCG 濃度とマイクロタイタープレートを用いた酵素免疫測定法で求めた hCG 濃度との関係を示すグラフである。

【図 25】 E2 濃度と電流密度 (D<sub>1</sub>) との関係を示すグラフである。

【図 26】 E2 濃度と電流密度 (D<sub>1</sub> + D<sub>2</sub>) との関係を示すグラフである。

【図 27】 本発明の検出部の信号検出系の一例を示す模式図である。

【図 28】 競合型 MEDIA 法における試料中の抗原の有無と標識酵素分布との関係を示す模式図である。

【図 29】 2 つの検出手段の信号強度 (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>) に対して測定誤差要因が与える影響の模式図である。

#### 【符号の説明】

- 1 試料液
- 2 抗原
- 3 酵素
- 4 酵素標識抗体
- 5 不溶化抗原
- 6 検出部 1
- 7 検出部 2
- 10 信号物質発生体

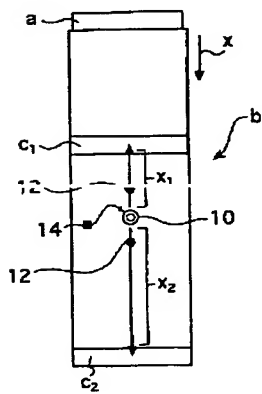
73

74

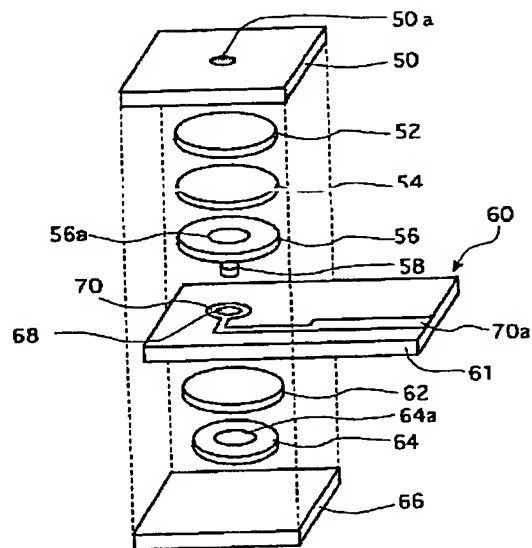
- 12 信号物質  
 14 信号物質の発生に与する物質  
 50 上面カバー  
 50a 試料導入口  
 52 フィルタ  
 54 第1含浸部  
 56 第2含浸部  
 56a, 64a シール部  
 58 連通部  
 60 電極部  
 61 基板  
 62 特異結合物質不溶化流路 (マトリクス)  
 64 吸収部  
 66 基台

- 68 貫通孔  
 70 対極 (参照極)  
 70a 対極 (参照極) 端子部  
 74 絶縁層  
 76 第1作用極 (検出部1)  
 76a 第1作用極端子部  
 78 第2作用極 (検出部2)  
 78b 第2作用極端子部  
 80 第3作用極 (検出部3)  
 80a 第3作用極端子部  
 10 a 試料導入口  
 b 流路  
 c 検出部

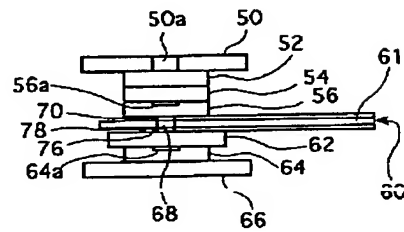
【図1】



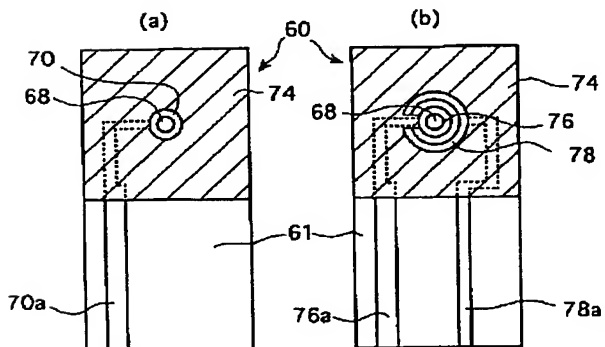
【図2】



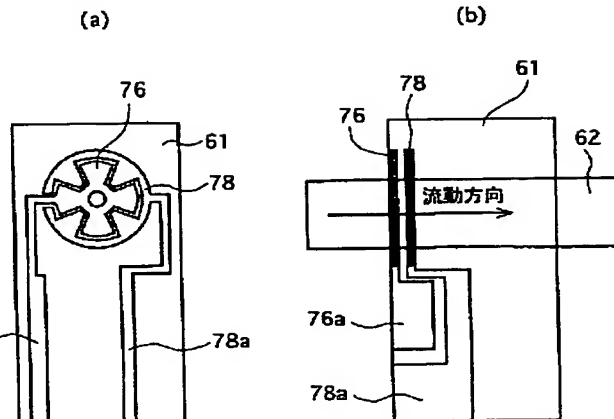
【図3】



【図4】

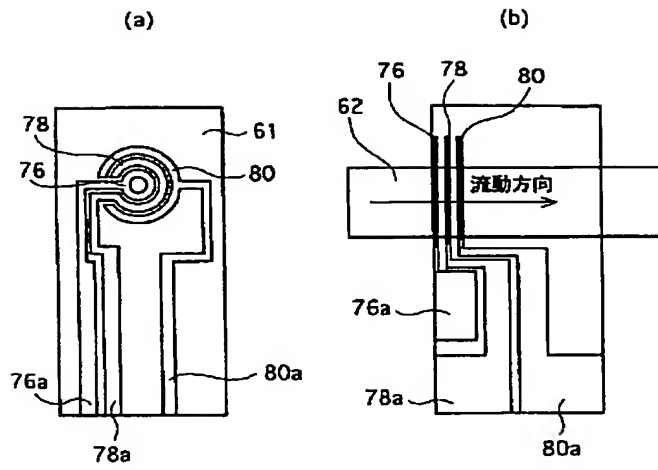


【図5】

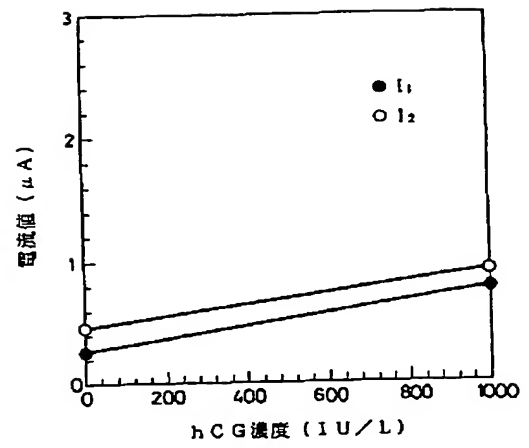




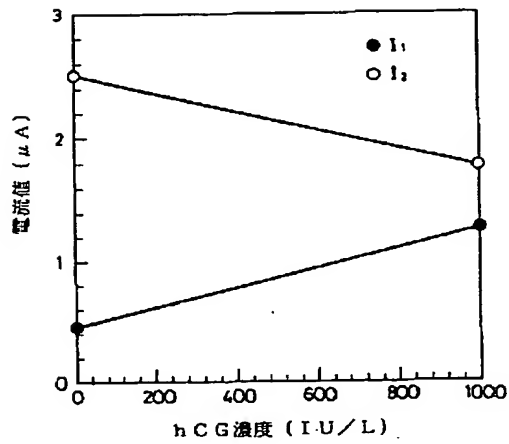
【図 6】



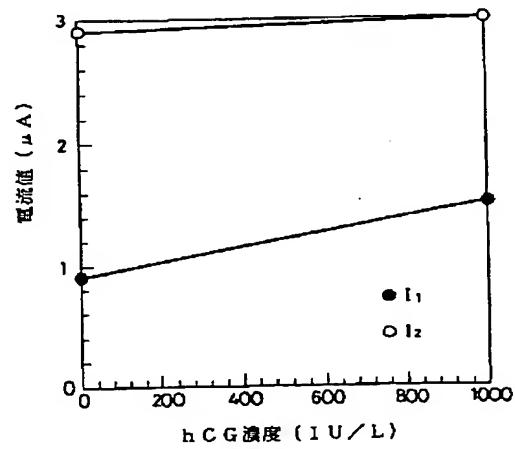
【図 7】



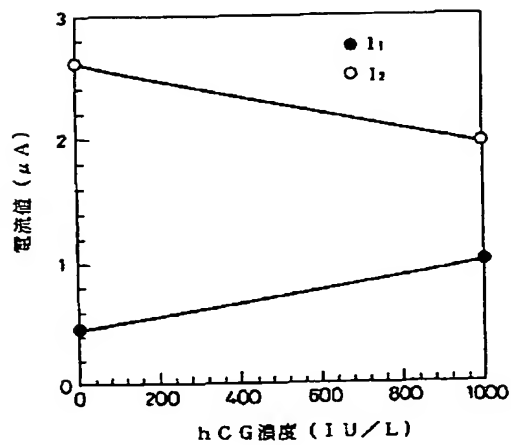
【図 8】



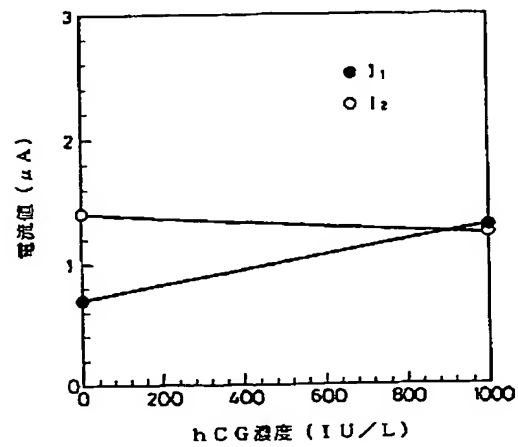
【図 9】



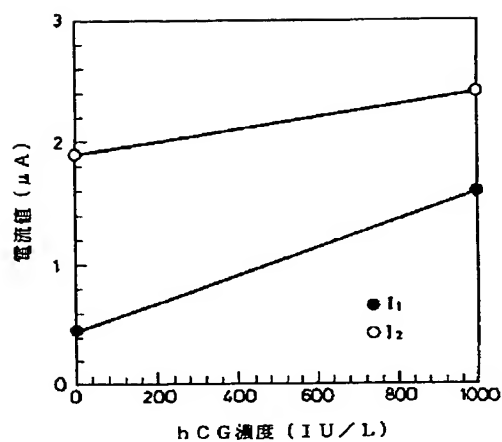
【図 10】



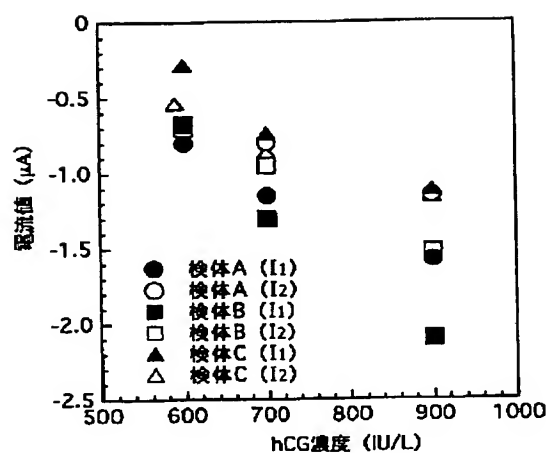
【図 11】



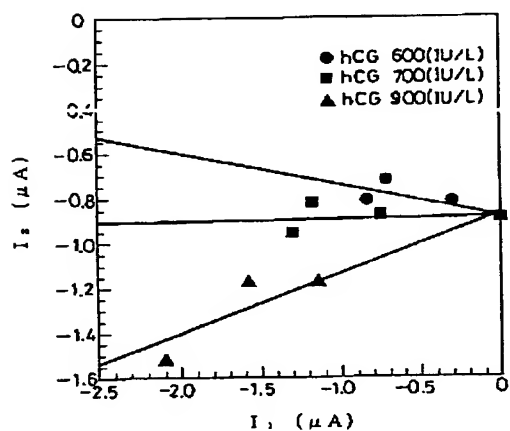
【図 1 2】



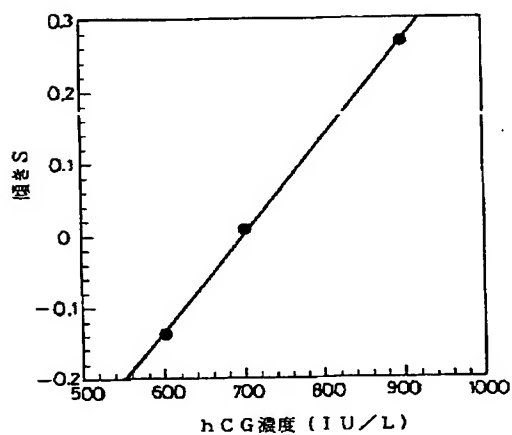
【図 1 3】



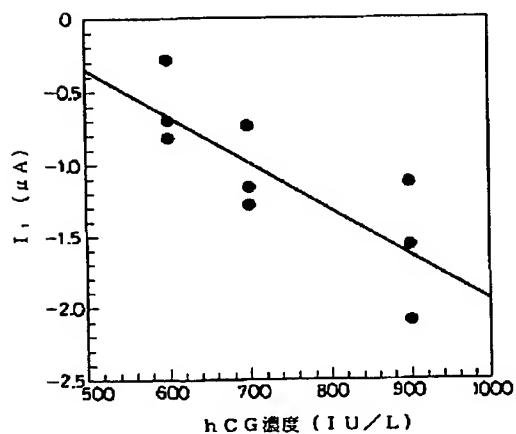
【図 1 4】



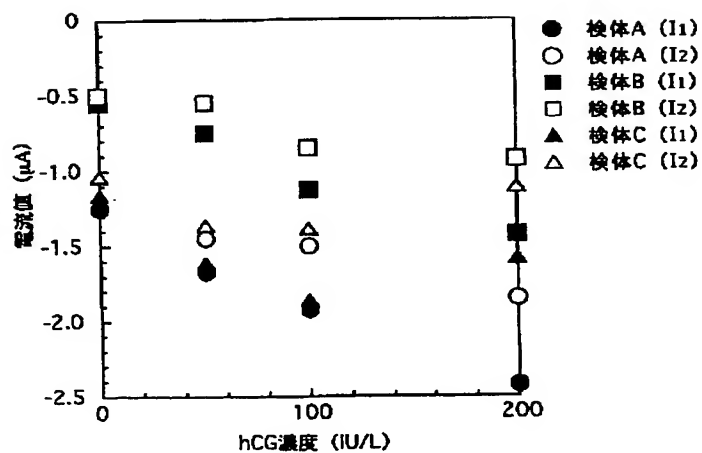
【図 1 5】



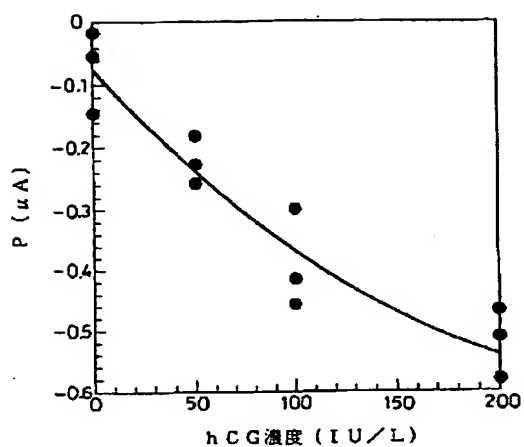
【図 1 6】



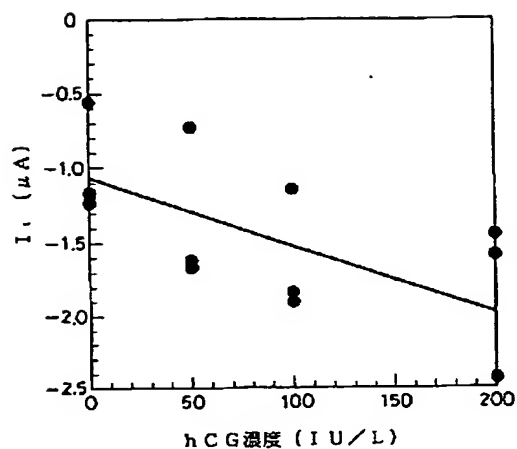
【図 1 7】



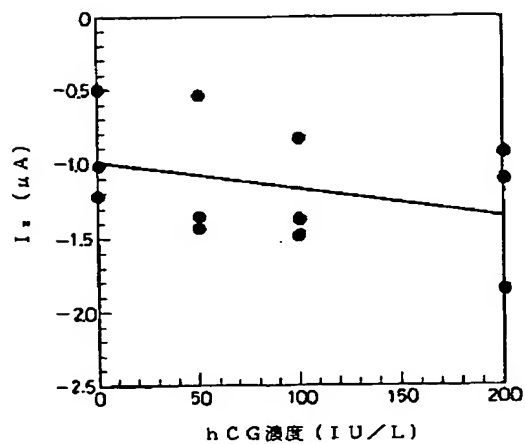
【図 18】



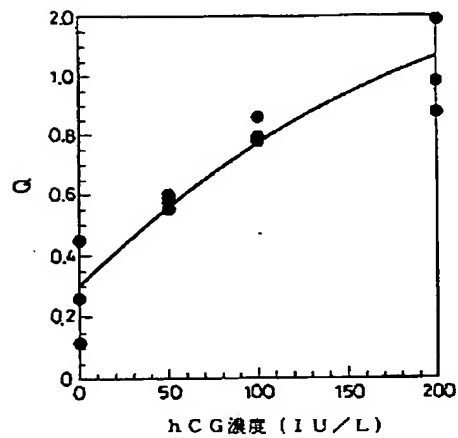
【図 19】



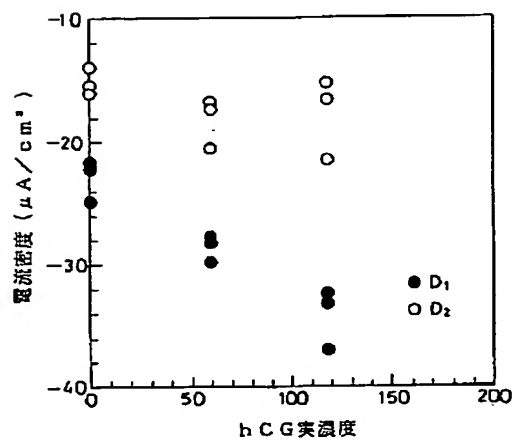
【図 20】



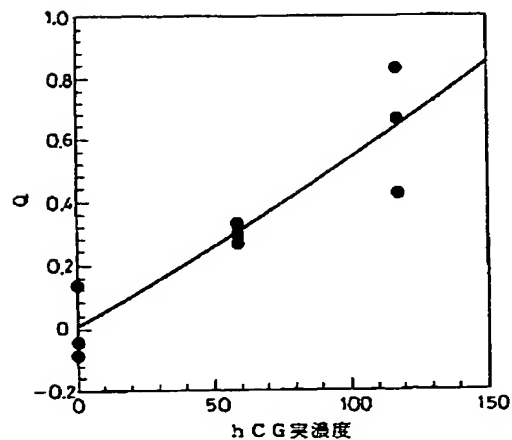
【図 21】



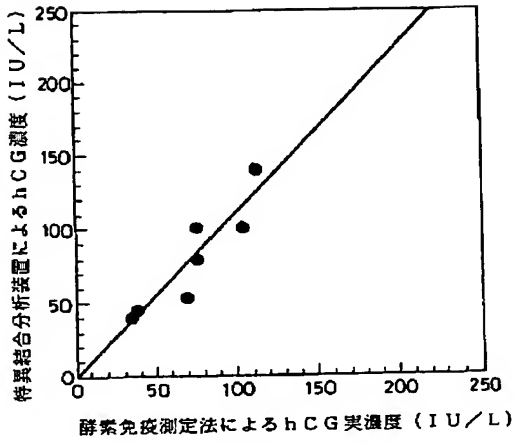
【図 22】



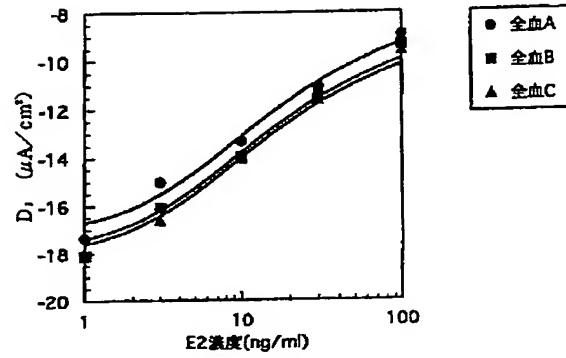
【図 23】



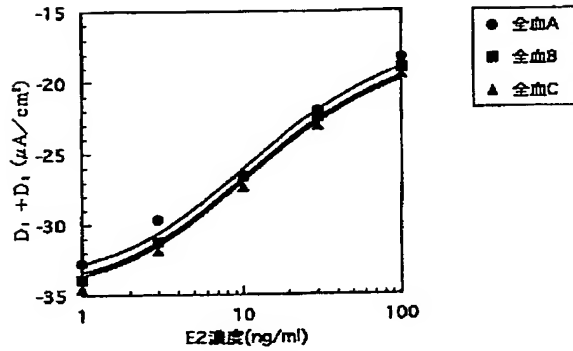
【図 24】



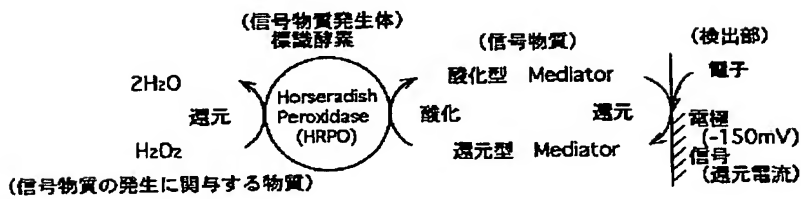
【図 25】



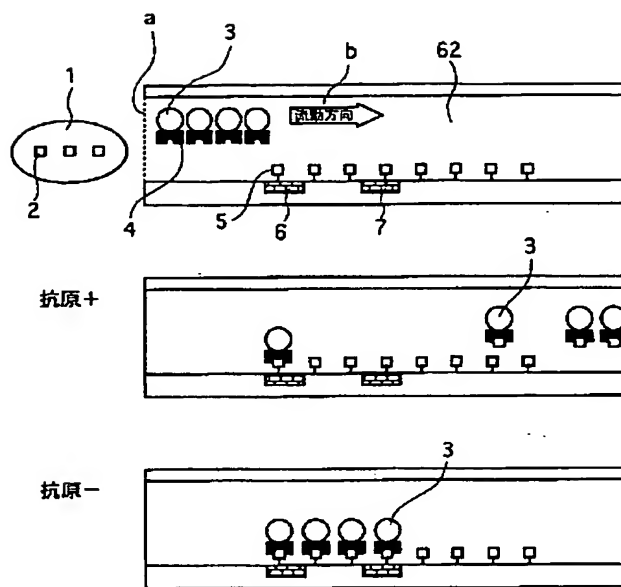
【図 26】



【図 27】



【図 28】



【図 29】

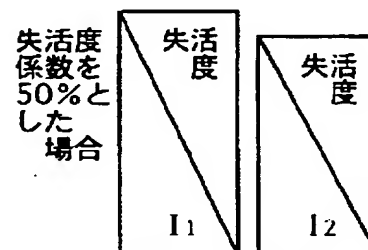
## 加算的影響

測定誤差要因例：  
試料中の酸化還元物質  
試料中のパーオキシダーゼ活性

## 比率的影響

測定誤差要因例：  
標識酵素の経時的な失活  
反応温度  
試料中の妨害物質

	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>
特異結合反応に 依存する信号成分 (シグナル)	抗原量 依存性	抗原量 依存性
非特異的な 信号成分 (ノイズ)	抗原量 非 依存性	抗原量 非 依存性







# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-075748

(43)Date of publication of application : 22.03.1996

(51)Int.Cl.

G01N 33/557

G01N 33/542

G01N 33/543

G01N 33/558

(21)Application number : 07-162297

(71)Applicant : MOCHIDA PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 28.06.1995

(72)Inventor : YAMAUCHI CHUICHI  
TERASAWA HIDEYUKI

(30)Priority

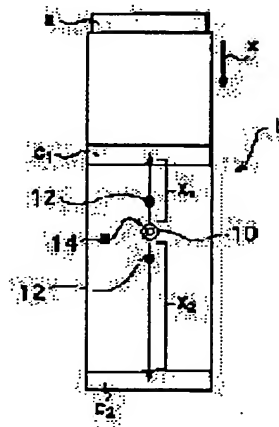
Priority number : 06146865 Priority date : 28.06.1994 Priority country : JP

## (54) METHOD AND APPARATUS FOR ANALYZING SPECIFIC BOND

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To rapidly measure the concn. of an object with high accuracy without performing washing operation by allowing a signal substance generating element participated in specific bonding reaction and generating a signal substance and a liquid specimen to flow to a passage and forming the distribution of the signal generating element corresponding to the concn. of the object by specific bonding reaction and detecting the generated signal substance.

**CONSTITUTION:** A plurality of detection parts C1, C2 are provided along a passage b and a liquid specimen with unknown concn. and signal substance generating matter 10 are introduced into the passage b from a specimen introducing part a to form the distribution of the signal generating matter 10 corresponding to the concn. of an object by specific bonding reaction and, if necessary, the substance 14 participated in the generation of a signal substance 12 is reacted. The generated signal substance 12 reaches the detection parts C1, C2 to emit signals and these signals are detected. The signals depend on the moving distances X1, X2 of the signal substance 12 moved through the passage by diffusion. Therefore, the distribution of the signal substance generating matter 10 corresponding to the concn. of the object can be detected from the signal emitted from the signal substance 12. The effect due to a non-specific factor is excluded by operational processing.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]



US005723345A

## United States Patent [19]

Yamauchi et al.

[11] Patent Number: 5,723,345

[45] Date of Patent: Mar. 3, 1998

## [54] METHOD AND DEVICE FOR SPECIFIC BINDING ASSAY

[75] Inventors: Tadakazu Yamauchi; Hideyuki Terasawa, both of Saitama, Japan

[73] Assignee: Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan

[21] Appl. No.: 495,028

[22] Filed: Jun. 27, 1995

## [30] Foreign Application Priority Data

Jun. 28, 1994 [JP] Japan ..... 6-146865

[51] Int. Cl.<sup>6</sup> ..... G01N 33/543; G01N 33/558; G01N 33/536

[52] U.S. Cl. .... 436/518; 204/400; 204/403; 422/57; 422/58; 422/82.01; 422/82.05; 422/82.08; 422/82.09; 435/7.1; 435/7.72; 435/7.9; 435/7.91; 435/7.92; 435/287.1; 435/287.2; 435/817; 436/169; 436/514; 436/531; 436/535; 436/536; 436/538; 436/805; 436/806

[58] Field of Search ..... 422/56-58, 68.1, 422/82.01, 82.05, 82.06-82.09; 435/7.1, 7.72, 7.9, 7.91, 7.92-7.94, 817, 962, 967, 969-971, 287.1, 287.2; 436/518, 531, 535-541, 169, 805, 806, 904, 514; 204/400, 403

## [56] References Cited

## U.S. PATENT DOCUMENTS

5,194,133	3/1993	Clark et al.	204/299
5,281,539	1/1994	Schramm	436/518
5,491,095	2/1996	Bepko et al.	436/518

## FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0525723 2/1993 European Pat. Off. .

5-264552 10/1993 Japan .  
WO91/16630 10/1991 WIPO .

## OTHER PUBLICATIONS

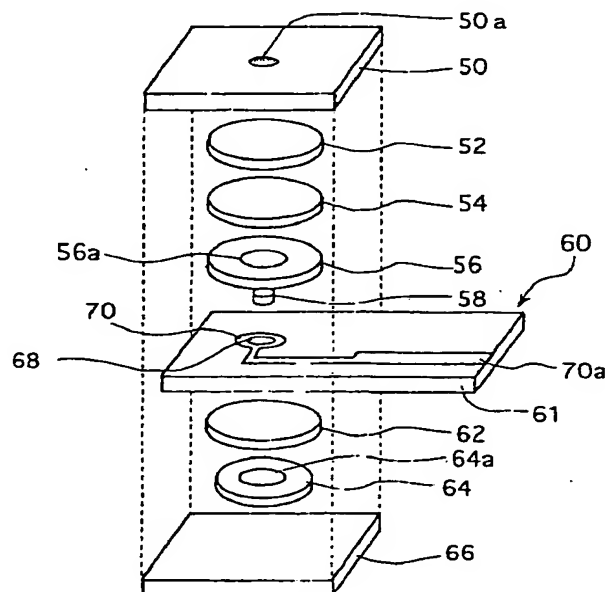
Patent Abstracts of Japan, vol. 18, No. 31, JP-A-5-264552 (Jan. 18, 1994).

Primary Examiner—Christopher L. Chin  
Attorney, Agent, or Firm—Birch, Stewart, Kolasch & Birch, LLP

## [57] ABSTRACT

The present invention provides a general purpose specific binding assay method which has the advantages of highly accurate and quick measurements which exclude the effects of various factors that decrease reliability of the measured values, such as non-specific reactants in test samples, assay conditions and inactivation and the like changes in the activity of reagents. The present invention is further drawn to a specific binding assay device suitable for the practice thereof. The binding assay of the present invention is achieved by allowing a signal substance generator which takes part in a specific binding reaction and generates a signal substance, together with a liquid sample, to flow through a predetermined channel in a predetermined direction, thereby effecting generation of the specific binding reaction of a substance to be assayed to form a distribution of the signal substance generator in the channel in response to the concentration of the substance to be assayed, allowing the signal substance generator distributed in the channel to generate the signal substance, detecting the generated signal substance by a plurality of detection means arranged at different positions in the liquid flow direction, and arithmetically processing the plural detection results to minimize influence of other factors than the concentration of the substance to be assayed upon the assay result.

9 Claims, 29 Drawing Sheets



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**